

(54) GENE OF YEAST BELONGING TO GENUS CANDIDA

- (11) 4-228080 (A) (43) 18.8.1992 (19) JP
 (21) Appl. No. 3-116596 (22) 20.4.1991 (33) JP (31) 90p.196226 (32) 26.7.1990
 (71) TAKARA SHUZO CO LTD (72) OSAMU TAKEDA(4)
 (51) Int. Cl⁵. C12N15/57, C12Q1/04, C12Q1/68//C12Q1/37(C12Q1/04, C12R1/72)

PURPOSE: To determine the secretory acidic protease gene sequence characteristic to a pathogenic yeast of genus *Candida* in a specimen and provide a detection method for the gene sequence and a kit therefor.

CONSTITUTION: The objective secretory acidic protease gene of a yeast belonging to the genus *Candida* has a length of 1023 and is expressed by the sequence number 1 of the sequence table. Also provided are a method for detecting the yeast of the genus *Candida* by detecting said gene and by using a detection kit containing a primer for amplifying said gene and a probe for detecting the amplified DNA. Yeast of the genus *Candida* in a specimen can be detected in high sensitivity.

(54) PRODUCTION OF L-TRYPTOPHAN

- (11) 4-228085 (A) (43) 18.8.1992 (19) JP
 (21) Appl. No. 3-115224 (22) 20.4.1991 (33) JP (31) 90p.236535 (32) 6.9.1990
 (71) MITSUBISHI PETROCHEM CO LTD (72) MASATO TERASAWA(5)
 (51) Int. Cl⁵. C12P13/22//C12P13/22, C12R1/13

PURPOSE: To provide a process for producing L-tryptophan in high efficiency by using a microorganism.

CONSTITUTION: Enzymatic reaction is carried out in a synthetic medium containing at least glucose and indole and free from biotin by using *Brevibacterium flavum* MJ-233 strain and the produced L-tryptophan is separated from the reaction liquid.

(54) AGENT FOR TREATMENT AND PREVENTION OF HYPERCALCEMIA

- (11) 4-228089 (A) (43) 18.8.1992 (19) JP
 (21) Appl. No. 3-110565 (22) 15.5.1991 (33) JP (31) 90p.124581 (32) 15.5.1990
 (71) KANEGAFUCHI CHEM IND CO LTD (72) YUKIO EGUCHI(3)
 (51) Int. Cl⁵. C12P21/08, A61K39/395, C12N5/10, C12N5/20, C12N15/13, C12N15/62//C12N15/06(C12P21/08, C12R1/91)

PURPOSE: To obtain the subject new treating and preventing agent capable of curing hypercalcemia in highly desirable result over a relatively long period by using an anti-human parathyroid hormone-relating protein monoclonal antibody or/its relating substance as active component.

CONSTITUTION: A hybridoma is prepared by mixing a human parathyroid hormone-relating protein (PTHrP) with Freund's complete adjuvant, immunizing a BALB mouse with the mixture by subcutaneous injection, collecting immunized splenocytes after booster immunization, fusing the cell with a mouse myeloma cell in the presence of polyethylene glycol and culturing the fused cell on HAT medium. The hybridoma is screened to select a clone capable of producing anti-PTHrP antibody, which is cloned by limiting dilution analysis, etc., to obtain a monoclonized hybridoma. The hybridoma is cultured to obtain an anti-PTHrP monoclonal antibody. The objective agent for the treatment or prevention of hypercalcemia can be prepared by using the antibody or its relating substance such as F(ab') fragment as active component.

BEST AVAILABLE COPY

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **04228089 A**

(43) Date of publication of application: **18.08.92**

(51) Int. Cl

C12P 21/08
A61K 39/395
C12N 5/10
C12N 5/20
C12N 15/13
C12N 15/62
// C12N 15/06
(C12P 21/08 , C12R 1:91)

(21) Application number: **03110565**

(22) Date of filing: **15.05.91**

(30) Priority: **15.05.90 JP 02124581**

(71) Applicant: **KANEGAFUCHI CHEM IND CO LTD**

(72) Inventor:
EGUCHI YUKIO
NAGAOKA TETSUYA
KUNIHIRO SHIGEKI
ASAHI KOJI

**(54) AGENT FOR TREATMENT AND PREVENTION OF
HYPERCALCEMIA**

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject new treating and preventing agent capable of curing hypercalcemia in highly desirable result over a relatively long period by using an anti-human parathyroid hormone-relating protein monoclonal antibody or/its relating substance as active component.

CONSTITUTION: A hybridoma is prepared by mixing a human parathyroid hormone-relating protein (PTHrP) with Freund's complete adjuvant, immunizing a BALB mouse with the mixture by subcutaneous injection, collecting immunized splenocytes after booster immunization, fusing the cell with a mouse myeloma cell in the presence of polyethylene glycol and culturing the fused cell on HAT medium. The hybridoma is screened to select a clone capable of producing anti-PTHrP antibody, which is cloned by limiting dilution analysis, etc., to obtain a monoclonized

hybridoma. The hybridoma is cultured to obtain an anti-PTHrP monoclonal antibody. The objective agent for the treatment or prevention of hypercalcemia can be prepared by using the antibody or its relating substance such as F(ab') fragment as active component.

COPYRIGHT: (C)1992,JPO&Japio

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平4-228089

(43)公開日 平成4年(1992)8月18日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/08		8214-4B		
A 6 1 K 39/395	A D D N	8413-4C		
C 1 2 N 5/10		8828-4B	C 1 2 N 15/00	A
		7236-4B	5/00	B

審査請求 未請求 請求項の数13(全 18 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平3-110565	(71)出願人	000000941 鯉淵化学工業株式会社 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号
(22)出願日	平成3年(1991)5月15日	(72)発明者	江口 行生 兵庫県明石市大久保町大窪250-1 パ レ・ロワイヤル荳番館701号
(31)優先権主張番号	特願平2-124581	(72)発明者	長岡 哲也 兵庫県高砂市高砂町沖浜町2-63 光雲寮
(32)優先日	平2(1990)5月15日	(72)発明者	国広 茂樹 兵庫県高砂市高砂町沖浜町2-63 光雲寮
(33)優先権主張国	日本(J P)	(72)発明者	旭 孝司 兵庫県神戸市垂水区つつじが丘3丁目10-6
		(74)代理人	弁理士 山本 秀策

(54)【発明の名称】 高カルシウム血症治療・予防剤

(57)【要約】 (修正有)

【構成】ヒト副甲状腺ホルモン関連タンパク (p T H r P) に対して特異性を有するモノクローナル抗体が、ハイブリドーマにより生産される。このハイブリドーマは、P T H r P またはその部分配列を有するペプチドにより免疫された動物由来の抗体産生細胞とミエローマ細胞との融合により得られる。さらに該モノクローナル抗体の可変部領域の遺伝子をクローニングし、これを用いてげっ歯/ヒトキメラモノクローナル抗体が作成される。

【効果】上記モノクローナル抗体は、高カルシウム血症治療・予防剤として有用である。本発明のモノクローナル抗体を用いることにより、従来の抗血清あるいはポリクローナル抗体を用いた方法よりも高成績でかつ比較的長期間にわたり高血症を治療することが可能である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 抗ヒト副甲状腺ホルモン関連タンパクモノクローナル抗体およびその関連物質でなる群から選択される少なくとも1種を有効成分として含有する高カルシウム血症治療・予防剤。

【請求項2】 前記モノクローナル抗体のF(ab')フラグメントおよび/または該フラグメントを含むペプチドを含む請求項1に記載の治療・予防剤。

【請求項3】 ハイブリドーマEV034B1GまたはEV01411Gの産生するモノクローナル抗体の群から選択されるモノクローナル抗体を含有する請求項1に記載の治療・予防剤。

【請求項4】 前記モノクローナル抗体のF(ab')フラグメントおよび/または該フラグメントを含むペプチドを含む請求項3に記載の治療・予防剤。

【請求項5】 抗ヒト副甲状腺ホルモン関連タンパクモノクローナル抗体のH鎖可変部領域をコードする遺伝子断片であって、配列番号1に記載のアミノ酸配列をコードする遺伝子配列を少なくともその一部に有する遺伝子断片。

【請求項6】 抗ヒト副甲状腺ホルモン関連タンパクモノクローナル抗体のL鎖可変部領域をコードする遺伝子断片であって、配列番号2に記載のアミノ酸配列をコードする遺伝子配列を少なくともその一部に有する遺伝子断片。

【請求項7】 抗ヒト副甲状腺ホルモン関連タンパクモノクローナル抗体であって、その可変部領域の少なくとも一部に配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する、モノクローナル抗体。

【請求項8】 抗ヒト副甲状腺ホルモン関連タンパクモノクローナル抗体であって、その可変部領域の少なくとも一部に配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する、モノクローナル抗体。

【請求項9】 げっ歯類由来の可変部領域およびヒト由来の定常部領域を有し、ヒトの副甲状腺ホルモン関連タンパクを認識するげっ歯類/ヒトキメラモノクローナル抗体、またはその誘導体。

【請求項10】 前記キメラモノクローナル抗体が高カルシウム血症の治療効果を有する、請求項9に記載のモノクローナル抗体またはその誘導体。

【請求項11】 請求項9に記載のキメラモノクローナル抗体をコードする融合遺伝子。

【請求項12】 請求項10に記載のキメラモノクローナル抗体およびその誘導体の少なくとも1種を有効成分として含有する高カルシウム血症治療・予防剤。

【請求項13】 請求項1、3、7、9または11のいずれかに記載のモノクローナル抗体を産生するセルライン。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は抗ヒト副甲状腺ホルモン関連タンパクモノクローナル抗体（以下、抗PTHrPモノクローナル抗体とする）を有効成分とする抗高カルシウム血症治療・予防剤に関する。さらに詳細には、本発明は医療分野において副甲状腺ホルモン関連タンパク（以下、PTHrPとする）の産生により発症する高カルシウム血症の治療および予防、さらには再発の防止に用いられる抗PTHrPモノクローナル抗体を有効成分とする治療・予防剤に関する。本発明はさらに、上記モノクローナル抗体の可変部領域のH鎖をコードする遺伝子断片およびL鎖をコードする遺伝子断片；げっ歯類由来の上記可変部領域とヒト由来の定常部領域とを有するキメラモノクローナル抗体、該キメラモノクローナル抗体を含有する高カルシウム血症治療・予防剤；および該キメラモノクローナル抗体をコードする融合遺伝子に関する。本発明は、さらに上記モノクローナル抗体を産生するセルラインに関する。

【0002】

【従来の技術】 高カルシウム血症は、医療分野においてしばしば見出される電解質異常症であり、患者に種々の苦痛を与えるのみならず、重篤な場合は生命を脅かすおそれがある。高カルシウム血症を惹起する原因疾患は多様であるが、高頻度でかつ重篤な高カルシウム血症を引き起こす原因疾患としては、悪性腫瘍および副甲状腺ホルモン（以下、PTHとする）の過剰産生による副甲状腺機能亢進症が挙げられる。

【0003】 このうち、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症は、その発生機序から、腫瘍細胞の骨への浸潤により骨溶解が亢進し高カルシウム血症がもたらされる症例（Local Osteolytic Hypercalcemia）と、腫瘍から産生される体液性因子が全身性に作用し高カルシウム血症が惹起される症例（Humoral Hypercalcemia of Malignancy, 以下、HHMとする）との2つに大別される。その代表的な前者の例としては、多発性骨髄腫、乳癌などの骨転移などによる高カルシウム血症が挙げられ、後者（HHM）の例としては、扁平上皮癌、腎尿路系の癌などに伴う高カルシウム血症などが挙げられる。

【0004】 このうち、HHMは、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症の80%以上を占める最も頻度の高い腫瘍随伴性症候群である。このHHMは、悪性腫瘍患者の末期に急速に発症し進展することが多く、さらに特異的治療法が存在しないことから多くの患者の死亡原因となっている。

【0005】 HHMの発症原因となる体液性因子については、多くの研究者により種々の研究がなされてきた。Stewart, A. F. らは、HHM患者の血漿中にPTHとは異なるがPTH類似の作用を示す物質の存在を証明し、かつ、HHMを惹起する悪性腫瘍細胞がこの物質を産生していることを明らかにした（Stewart, A. F. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80巻, 1454頁(1983)；およびGoltzman,

D. ら, J. Clin. Endocrinol. Metab., 53巻, 899頁(1981))。

【0006】Martin, T. J. のグループは、高カルシウム血症を呈した肺癌患者の癌細胞(BEN細胞)の培養上清からPTH様活性を有する物質を単離し、該物質のN末端の一次構造を明らかにした。さらに、該細胞のmRNAを用いてPTH様物質のcDNAを単離し、PTH様物質の前駆体の全一次構造を決定した(Moseley, J. M. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84巻, 5048頁(1987); および Suv a, L. J. ら, Science, 237巻, 893頁(1987))。そこではPTH様物質はPTHrPと称され、36個のシグナルペプチドに続く141個のアミノ酸残基よりなること、そして、C末端の一次構造はPTHと殆ど類似性がないが、N末端の1-13位のアミノ酸のうち8個は同一のアミノ酸からなると報告されている。PTHがその受容体と結合する機能; PTHが腎原性サイクリックAMPの産生を亢進する機能など、PTHがその生理活性を発現するにはN末端部分が不可欠であるとされている。従って、PTHrPがPTHと類似のN末端アミノ酸構造を有しているためにPTH様活性を有すると考えられる。

【0007】Horiuchi N. らは、PTHrPの1-34位のペプチドを化学合成しラットに投与すると、高カルシウム血症状態を示すことを報告している(Science, 238巻, 566頁(1987))。さらに、Kukreja, S. C. らは、高カルシウム血症を呈した肺癌患者および喉頭癌患者のそれぞれの癌細胞を無胸腺マウスに移植し、高カルシウム血症を示した時点でPTHrP(1-34)およびPTHrP(1-16)ペプチドに対するウサギ抗血清を投与すると、一部のマウスで血中カルシウムが正常レベルに減少したことを報告している(J. Clin. Invest, 82巻, 1798頁(1988))。このように、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症の原因物質としてPTHrPが重要な役割を果たしていることが知られている。

【0008】ところで、従来、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症の治療には補液、およびフロセミドもしくはエタクリン酸を併用するが、一般にはこれだけでは不十分であり、さらにカルシトニン、ミスラマイシンなどの追加投与を必要とする。しかし、カルシトニンは連続投与により効果が低下すること、そして、ミスラマイシンは重篤な副作用を惹起するなどの欠点があり、十分な効果を発揮するには至っていない。このような悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症の治療には、上記のようにPTHrP活性を特異的に阻害する薬剤が好ましいと考えられる。PTHrP活性だけを特異的に抑制する方法としては、上記のKukreja, S. C. らの研究例があるが、報告されている方法はウサギ抗血清あるいはそれを精製して得られるポリクローナル抗体を用いているため、治療成績が悪く、かつ、有効症例においてもその有効期間は非常に短いという欠点がある。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記従来の問題点を解決するものであり、その目的とするところは、高カルシウム血症に有効な治療・予防剤を提供することにある。本発明の他の目的は、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症に有効な治療・予防剤を提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の問題点を克服するため鋭意研究を重ねた結果、ヒトPTHrPに対して特異性を有するモノクローナル抗体を取得することに成功し、該モノクローナル抗体を用いることにより、高カルシウム血症を高成績で、かつ比較的長期間にわたり治療し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0011】本発明の高カルシウム血症治療・予防剤は、抗ヒト副甲状腺ホルモン関連タンパクモノクローナル抗体およびその関連物質でなる群から選択される少なくとも1種を有効成分として含有し、そのことにより上記目的が達成される。

【0012】本発明は、抗ヒト副甲状腺ホルモン関連タンパクモノクローナル抗体のH鎖可変部領域をコードする遺伝子断片であって、配列番号1に記載のアミノ酸配列をコードする遺伝子配列を少なくともその一部に有する遺伝子断片を包含する。

【0013】本発明は、抗ヒト副甲状腺ホルモン関連タンパクモノクローナル抗体のL鎖可変部領域をコードする遺伝子断片であって、配列番号2に記載のアミノ酸配列をコードする遺伝子配列を少なくともその一部に有する遺伝子断片を包含する。

【0014】本発明は、抗ヒト副甲状腺ホルモン関連タンパクモノクローナル抗体であって、その可変部領域の少なくとも一部に配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体を包含する。

【0015】本発明は、抗ヒト副甲状腺ホルモン関連タンパクモノクローナル抗体であって、その可変部領域の少なくとも一部に配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体を包含する。

【0016】本発明は、げっ歯類由来の可変部領域およびヒト由来の定常部領域からなり、ヒトの副甲状腺ホルモン関連タンパクを認識するげっ歯類/ヒトキメラモノクローナル抗体、およびその誘導体を包含する。

【0017】本発明は、前記キメラモノクローナル抗体をコードする融合遺伝子を包含する。

【0018】本発明は、上記キメラモノクローナル抗体およびその誘導体の少なくとも1種を有効成分として含有する高カルシウム血症治療・予防剤を包含する。

【0019】本発明は、上記モノクローナル抗体を産生するセルラインを包含する。

【0020】本発明のモノクローナル抗体を調製するためには、従来からのモノクローナル抗体調製法を用いる

5

ことができる。つまり、抗原で免疫した動物から得られる抗体産生細胞と、ミエローマ細胞との細胞融合によりハイブリドーマを調製し、得られたハイブリドーマの中からPTHrP活性を特異的に阻害する抗体を産生しているクローンを選択することによって調製される。

【0021】上記免疫に用いられる抗原としては、組換えDNA法または化学合成法により調製したPTHrPのアミノ酸配列の全部または一部のペプチドや、高カルシウム血症を惹起した癌細胞の培養上清液由来のPTHrPなどが利用可能である。PTHrPのアミノ酸配列の一部を含有するペプチドとしては、例えばPTHrPのN末端部分に位置する、次の配列(配列番号7に示す)を有するペプチドが挙げられる: Ala-Val-Ser-Glu-His-Gln-Leu-Leu-His-Asp-Lys-Gly-Lys-Ser-Ile-Gln-Asp-Leu-Arg-Arg-Arg-Phe-Phe-Leu-His-His-Leu-Ile-Ala-Glu-Ile-His-Thr-Ala。抗体産生細胞は、例えばPTHrPまたはその一部に相当するペプチド(同等の作用を有する物質)によってインビボあるいはインビトロで免疫された動物あるいはヒトの脾細胞由来のあるいはリンパ節細胞由来のBリンパ球や、患者末梢血由来のBリンパ球が使用できる。

【0022】細胞融合に用いるミエローマ細胞としては、マウス、ラット、ヒト、およびその他の動物由来のミエローマ細胞を用いることができる。細胞融合は、例えばポリエチレングリコールを用いる方法(岩崎辰夫ら、「単クローン抗体、ハイブリドーマとELISA」講談社発行(1983)参照)により行うことができる。細胞融合によって得られたハイブリドーマはスクリーニング(例えば、酵素抗体法)に付され、抗体を産生するハイブリドーマが選択される。得られた抗体産生ハイブリドーマはクローニング(例えば、限界希釈法)に付される。得られたクローンは、次いでスクリーニングに付され、目的とするモノクローナル抗体を産生するクローンが選択される。例えば、ラット骨髄腫細胞ROS17/2.8細胞またはUMR106細胞にPTHrPを添加することにより、アデニレートサイクレス活性が向上する(アデニレートサイクレス促進活性が得られる)が、これに対して、抗PTHrPモノクローナル抗体が存在すると、その活性が阻害されることによってスクリーニングが行われる。

【0023】得られたハイブリドーマのうちEV034B1GおよびEV01411Gの2種は、微生物工業技術研究所特許微生物寄託センターにそれぞれ微菌研寄第11429(FERM P-11429)および第11430号(FERM P-11430)として寄託されている。EV034B1Gは、PTHrPの1-34アミノ酸残基のペプチドを抗原として調製され、目的とする抗体を産生するハイブリドーマクローンである。EV01411Gは、組換えDNA法により得られたPTHrP(以下、rPTHrPとする)を抗原として調製され、目的抗体を産生するハイブリドーマクローンである。

【0024】得られたハイブリドーマによる抗PTHrPモノクローナル抗体の産生量は、該ハイブリドーマを培養

6

し、その培養上清中の抗体価を、例えば酵素抗体法で測定することによって検定することができる。得られたハイブリドーマから抗PTHrPモノクローナル抗体を得るには、例えば、該ハイブリドーマを培養し、その培養上清から適切な方法により抗体を分取するか、または、ハイブリドーマをあらかじめプリスタン処理したマウスの腹腔内に移植し、増殖させた後、そのマウスの腹水から抗体を分取する。抗PTHrPモノクローナル抗体の調製には、組換えDNA法を用いた動物細胞または微生物を用いることも可能である。上記抗体の精製は、通常の生化学的手法を組み合わせることによって行われ得る。例えば、硫酸沈澱分画法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過法、PEG分画法、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、電気泳動などを適宜組み合わせることによって行われ得る。精製されたモノクローナル抗体は、生物学的製剤の製剤化に通常用いられる方法によって製剤化される。例えば、メンブランフィルターなどによる濾過除菌操作を行った後に、安定化剤と共に滅菌バイアルに凍結乾燥される。

【0025】このようにして得られた抗PTHrP抗体の高カルシウム血症の治療・予防効果は、高カルシウム血症モデル動物に、抗PTHrPモノクローナル抗体を投与し、血中カルシウムレベルの低下の有無によって調べる実験系を用いることにより確認される。上記高カルシウム血症モデル動物としては、例えば、発病の原因等であるPTHrPあるいはPTHrP(1-34)ペプチドを1日当たり約6ナノモル連続投与することによって作製した高カルシウム血症モデル動物、あるいはPTHrPを産生するヒト癌細胞(例えばPC-3細胞)をヌードマウスに移植することによって得られる担癌高カルシウム血症モデル動物がある。本発明の抗PTHrPモノクローナル抗体は、このいずれの方法においても血中カルシウムレベルを正常レベルまで下げることが確認された。従って、本発明の抗PTHrPモノクローナル抗体は、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症の治療・予防剤として非常に好適であり、産業上の利用価値がきわめて高い。

【0026】さらに、モノクローナル抗体そのものに限定されず、その関連物質、つまり該モノクローナル抗体の免疫学的特性を有するフラグメント、例えば、F(ab')フラグメント、さらに、該フラグメントを含むペプチドを含有する製剤も高カルシウム血症治療・予防剤として使用され得る。

【0027】発明者らは、さらに、上記抗PTHrPモノクローナル抗体の抗原認識部位に関する検討を行った。発明者らは、上記モノクローナル抗体のH鎖およびL鎖の変異部領域の遺伝子配列を明かにすることを試みた。上記H鎖の変異部領域をコードする遺伝子(VDJ_H)およびL鎖の変異部領域をコードする遺伝子(VDJ_L)は、該モノクローナル抗体を産生するハイブリ

一マから、下記のようにmRNAを単離し、cDNAを合成して、これを用いたPCR法を行うことにより決定され得る。

【0028】まず、本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞、例えば、前記のEVO34BIGまたはEVO34BIGから、一般的手法により全RNAを抽出する。さらに抽出された全RNAから、常法により、例えば、市販のキットであるオリゴテックス-dt30(宝酒造社製)を用いて、mRNAの単離を行う。次いで、得られたmRNAからcDNAを合成し、これをPCRの鋳型とする。

【0029】次に、IgGの変数領域中に存在する保存的な配列をKabatらのデータファイル(Sequences of Proteins Immunological Interest, US Dept. of Health and Human Services, US Government Printing Office (1987)から採用し、この配列からプライマーを設計する。上記配列は成熟タンパク質のアミノ末端付近に対応するDNA配列であり、シグナル配列が含まれていない。この配列の一部をPCRに用いるプライマーとして選択する(プライマーの配列を配列番号8~11に示す)。PCRにより得られる可変部領域遺伝子の塩基配列を、例えば、Sanger, F.R. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74巻, 5463頁 (1977))のジデオキシ法あるいはそれを改良した方法により決定する。

【0030】このようにして得られたDNA配列を配列番号5(H鎖)および配列番号6(L鎖)に示す。プライマー部分の配列を考慮すると、H鎖の可変部領域をコードする遺伝子は、配列番号5の34番目のCから354番目のTまでのDNA配列を有することがわかる。プライマー部分を除いた目的のDNA配列に対応するアミノ酸配列を配列番号1に示す。L鎖の可変部領域をコードする遺伝子は、配列番号6の32番目のCから340番目のAまでのDNA配列を有する。このDNA配列に対応するプライマー部分を除いた目的のアミノ酸配列を配列番号2に示す。

【0031】ところで、上記ハイブリドーマEVO34BIG, EVO1411Gなどにより産生される抗PTHrPモノクローナル抗体は、高カルシウム血症の治療・予防剤として有用であるが、これらのハイブリドーマはげっ歯類であるマウス由来であるため、これをヒトに長期間投与するとアレルギー反応が起こる場合がある。上記のように、このモノクローナル抗体の可変部領域の配列が明らかになったため、次に発明者らは、これをヒト抗体の定常部領域に結合させたげっ歯類/ヒトキメラモノクローナル抗体の調製を試みた。

【0032】本発明のげっ歯類/ヒトキメラモノクローナル抗体を作製するために必要なヒト免疫グロブリン定常部領域遺伝子(H鎖の定常部領域に対応する遺伝子: C γ 1、およびL鎖の定常部領域に対応する遺伝子: C κ)は、例えば、ヒト免疫グロブリン産生ガン細胞AR

H-77[ATCC(アメリカンタイプカルチャーコレクション)より入手可能である]から得られうる。

まず、ARH-77(ATCC CRL-1621)を培養し、得られた細胞からゲノムDNAを得る。このゲノムDNAから目的とするDNA断片を得るために必要とされる制限酵素を用いて完全に分解した後、アガロースゲル電気泳動で分子量分画し、該目的のDNA断片(C γ 1を含むDNA断片およびC κ を含むDNA断片)を得る。

【0033】このようにして得られるDNA断片は、適当なクローニングベクターに組み込まれて、DNAライブラリーが構築される。例えば、ヒトIgGのC γ 1を含むDNA断片は、EcoRIで切断したラムダクローニングベクター-EMBL4(ストラタジーン社製)にクローニングし、H鎖ファージライブラリーが構築される。一方、ヒトIgGのC κ を含むDNA断片は、EcoRIで切断したラムダクローニングベクター- λ gt10(ストラタジーン社製)にクローニングし、同様にして、L鎖ファージライブラリーが構築される。

【0034】このようにして増幅されたDNA断片から、目的とするC γ 1およびC κ 断片を、プローブを用いたハイブリダイゼーション法によりスクリーニングする。上記プローブは、Billson J.W. (Nucleic Acids Research, 10巻, 4071頁 (1982)が明かにしたC γ 1およびC κ の配列に基づいて作製される。例えばC γ 1の遺伝子から2個のプローブ(プローブH1およびH2;それぞれ配列番号12および13に示される)が設計される。プローブH1およびH2は、ARH-77のJ μ 領域(Kudou A. J. Imm. 135巻, 642頁 (1985))およびフレームワーク領域に対応する遺伝子配列である。他方、C κ 遺伝子からプローブL1(配列番号14に示す)が設計される。

【0035】上記ヒトIgG定常部領域遺伝子のスクリーニングは、常法に従って、ブランクハイブリダイゼーション法により行われる。まず上記各々のファージライブラリーを適切な株に感染させ、上記プローブとハイブリダイズするブランクをスクリーニングする。次にジデオキシ法で塩基配列の決定を行い、タンパク質をコードする部分の遺伝子が、すでに明らかになっているC γ 1またはC κ の配列と一致することを確認する。それぞれの挿入断片を適当な制限酵素を用いて切り出し、サブクローニングする。例えば、C γ 1断片をHindIIIとXbaIとで切り出し、pUC19にサブクローニングし、C γ 1断片を有するベクターであるpUC-C γ 1を得る。同様にC κ 断片をEcoRIで切り出し、pUC19にサブクローニングし、C κ を有するベクターであるpL14-2を得る。

【0036】上記抗PTHrP抗体のH鎖の可変部領域をコードするマウス由来のDNA配列、抗PTHrP抗体のL鎖の可変部領域をコードするマウス由来のDNA

配列、ヒトIgGのH鎖の定常部領域をコードするDNA発現ベクターを構築し、これを適当な宿主に導入して得られる形質転換体により、上記マウス由来の抗PTHrP抗体の可変部領域とヒトIgGの定常部領域とを有するキメラモノクローナル抗体が生産され得る。

【0037】上記発現ベクターの構築を行うために、まず、上記マウスVDJ_H遺伝子の修飾を行い、タンパク質の分泌に不可欠なシグナル配列を付加する。例えば、Cabilly, Sらの報告(Proc. Natl. Sci. USA., 81巻、3272頁(1984))にある抗PTHrP抗体(Anti-CEA MoAb)のH鎖のシグナル配列の一部に対応する部分を含む遺伝子を合成する。これをプライマー(配列番号15に示す)とし、上記VDJ_H遺伝子を鋳型としたPCRを行い、シグナル配列が付加されたLVDJ_H遺伝子が得られる。同様に、マウスVJ_L遺伝子についても上記Anti-CEA MoAbのL鎖のシグナル配列の一部に対応する部分を含む遺伝子を合成し、これをプライマー(配列番号16に示す)としてPCRを行い、シグナル配列が付加されたLVJ_L遺伝子が得られる。

【0038】本発明のキメラ抗体発現ベクターを調製方法の一例を次に説明する。

【0039】まず、pSVeSalI-HindIII(ヨーロッパ特許出願公開No. 0420502をHindIIIで切断して、平滑末端化し、pXbaIリンカーを付加し、T4DNAリガーゼで環状化するとpSVeXbaIが得られる(図2)。このベクターにはXbaI認識部位の上流にSV40の複製起点を含む初期プロモーター領域が存在している。次に、上記ヒトH鎖C γ 1遺伝子を含むプラスミドpUC-C γ 1から切り出した、C γ 1遺伝子を含むDNA断片と；上記マウスH鎖のLVDJ_H遺伝子断片を含む断片と；pSVeXbaIをXbaIで切断したベクターとを連結することによりpSVeH26が構築される(図2参照)。

【0040】これとは別に、C κ 遺伝子をpUC19にサブクローニングして得られるベクターpL14-2(前出)由来のC κ 遺伝子を含む断片；およびpSVeXbaIの切断断片をT4DNAリガーゼで連結することにより、pSVeL26が得られる(図3)。

【0041】上記pSVeL26由来のmLVJ_L遺伝子およびC κ 遺伝子を有するDNA断片；およびpSVeH26由来のmLVDJ_H遺伝子およびC γ 1遺伝子とを有するDNA断片とを連結することにより、これら4種の遺伝子を有する発現ベクターであるpSVeHL26が構築される(図4)。さらに、この発現ベクターを動物細胞に導入することを考慮し、該ベクターに適当な薬剤耐性遺伝子、例えば、DHFRおよびEcoR^rptが導入され、pSVeHL26-DMが構築される(図5)。

【0042】このようにして得られた発現ベクターは、

適当な宿主、例えば、マウス骨髓腫細胞あるいは、ハムスター細胞株に導入される。例えば、マウス骨髓腫細胞であるFO細胞にDEAE-デキストラン法で発現ベクターが導入され得る(高井俊行、細胞工学、9巻、652頁(1990))。あるいは、ハムスター細胞であるチャニーズハムスター卵巣(CHO)細胞(ATCC CCL-61)にリン酸カルシウム法で、Chenら、(Mol. Cell Biol., 7巻、2745頁(1987))の方法により、発現ベクターが導入され得る。

【0043】宿主に発現ベクターが導入されたか否かは、該ベクターが有する薬剤耐性マーカーを利用して調べることが可能である、このようにして得られた形質転換体が産生する抗体は、PTHrPに対する結合能を調べることで抗PTHrPモノクローナル抗体であることが確認される。産生された抗体量は、例えば、ELISA法により測定され得る。本法により得られた代表的な形質転換体の名称を後述の実施例10の表2に示す。

【0044】このような形質転換体を適当な培地で培養することにより抗ヒト副甲状腺ホルモン関連タンパクを認識するマウス/ヒトキメラモノクローナル抗体が生産される。このモノクローナル抗体は、上記マウス由来のモノクローナル抗体と同等の性能を有し、高カルシウム血症の治療・予防剤として好適に利用され得る。さらに、このモノクローナル抗体をヒトに長期間にわたり投与した場合もマウス由来のモノクローナル抗体の場合とは異なり、アレルギー反応を引き起こすことがない。

【0045】上記組み換えによるキメラ抗体発現ベクターの構築において、例えばマウスモノクローナル抗体遺伝子の可変部領域遺伝子の特定部位を要異することにより、生成する抗体の1個または数個のアミノ酸の置換、欠失、付加あるいは転位を起こさせることが可能であり、よりPTHrPに対して特異性や親和性の高い抗体に改良することができる。

【0046】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0047】【実施例1】(rPTHrPの調製) Martin, T. J. ら(J. Biol. Chem., 264巻、14806頁(1989))の方法に準じ、次のようにPTHrP遺伝子を合成し、大腸菌に組み込んで発現させてrPTHrPを得、これを後述の実施例4で得られた抗PTHrPモノクローナル抗体で精製した。

【0048】まず、DNA合成機(アプライドバイオシステム社製)を用いて、約110merの大きさのDNA(いずれもPTHrPの1~141位のDNAのうちの一部)を8本合成し、各DNAをODSカラム(山村化学研究所製)を用いた高速液体クロマトグラフィー(島津製作所社製)で精製し、次いでアニールを行った。その後、各DNAフラグメントをT4DNAリガーゼ(宝酒造社製)により連結させ、

目的とするPTHrP(1-141)遺伝子を得た。このPTHrP遺伝子をベクターpKK233-2(ファルマシア社製)に組み込んで発現ベクターを得た。これを大腸菌JM105に導入して形質転換体を得た。このrPTHrP発現大腸菌を大量調製した後、超音波処理により大腸菌を溶菌させた後、rPTHrPを抽出した。rPTHrP抽出物をセファクリルS-200HR(ファルマシア社製)を用いてゲル濾過し、分子量1万5千~3万付近を分画した。この画分を、CNBr活性化セファロース4B(ファルマシア社製)と、後述の実施例4で精製して得た抗PTHrP(1-34)モノクローナル抗体とをカップリングさせた(5mg/担体)抗体カラムにチャージして精製した。一回の精製で取得されたrPTHrPは約10mgであった。

【0049】[実施例2](抗PTHrPモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの調製) PTHrPのN末端部分のペプチドであるPTHrP(1-34)(ペプチド研究所製)、または実施例1で得られたrPTHrPペプチド50μgをフロイント完全アジュバントと混合した後、8~12週令のBalb/cマウスの皮下へ免疫した。初回免疫後、3週間間隔で計3回の追加免疫を行った。細胞融合に供する7日、5日、3日、2日、および1日前に、マウス尾静脈より一匹当たり5μgの上記ペプチドを投与した。その後、マウス脾を摘出し、免疫脾細胞を得た。

【0050】次に、免疫脾細胞とマウスミエローマ細胞(F0)とを2:1の割合で混合し、ポリエチレングリコール1500の存在下で融合させ、10%FBSを含むイスコフ改良ダルベッコ培地に、脾細胞が 2×10^6 個/mlになるように調整し、96穴マイクロプレートに0.1ml/ウェルの割合で分注した。翌日、HAT培地を0.1ml/ウェルの割合で加え、以後1日おきに培地の半量を新しいHAT培地と交換した。約2週間後、ハイブリドーマのコロニーの形成が見られた。このコロニーをさらに24穴プレートで培養し、PTHrP(1-34)由来のハイブリドーマクローン420株およびrPTHrP由来のハイブリドーマクローン617株を得た。

【0051】これらのハイブリドーマクローンの培養上清中に抗PTHrPモノクローナル抗体が産生されているかを、次のように酵素抗体法により検討した。まず、rPTHrPを用い、100ng/ウェルの割合でコーティングした96穴プレートにハイブリドーマの培養上清を加え、37℃で1時間反応させた。洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG+IgMを加えた。さらに洗浄した後、o-フェニレンジアミン液を加え、室温にて20分間発色させた。4N硫酸を加えて反応を停止させた後、492nmで吸光度を測定した。

【0052】以上の操作により、抗原としてPTHrP(1-3

4)を用いた場合には191株の、またrPTHrPを用いた場合には358株の抗PTHrPモノクローナル抗体を産生しているハイブリドーマクローンが得られたことがわかった。

【0053】次に、これらのハイブリドーマクローンの培養上清を用いて、rPTHrPに対する抗PTHrPモノクローナル抗体の中和活性能について検討した。Gutierrez, G. R. ら(J. Biol. Chem., 262巻, 15845頁(1987))の方法に準じて、次の方法により、(H) アデニンを取り込ませた、ROS17/2.8細胞またはUMR106細胞における(H) ATPから(H) cAMPへの変換を指標として測定した。まず、48穴マルチウェルプレートに 2.5×10^4 個/ウェルのROS17/2.8細胞またはUMR106細胞を接種し、FBSを10%の割合で添加したDMF培地中で3日間培養した。培養液を除去した後、Hanksの平衡塩類液で2回洗浄し、新しい培地および $1 \mu\text{Ci/ml}$ の(H) アデニンを加え、37℃で2時間インキュベートした。細胞をさらに2回洗浄した後、 1 mM 3-イソブチル-1-メチルキサンテン(IBMx; シグマ社製)を含み、FBSを2%の割合で添加したDMF培地50μlを加え37℃で5分間インキュベートした。次いでハイブリドーマ培養上清25μlおよびrPTHrP溶液(最終濃度 $10^{-7} \sim 10^{-1} \text{ M}$) 25μlを加え、さらに10分間インキュベートした。次いで、トリクロル酢酸(最終濃度0.12M) 1mlを加えて反応を終了させ、4N NaOH 20μlで中和した。合成されたcAMPは、Salomon, Y. ら(Anal. Biochem., 58巻, 541頁(1974))の方法にしたがって分離した後、その放射活性を測定し、rPTHrPに対する抗PTHrPモノクローナル抗体の中和活性能を評価した。

【0054】以上の操作により、抗原としてPTHrP(1-34)を用いた場合には108株が、そしてrPTHrPを用いた場合には35株が、rPTHrPを中和する活性を有する抗PTHrPモノクローナル抗体を産生しているハイブリドーマクローンであることがわかった。

【0055】[実施例3](ハイブリドーマにより産生された抗PTHrPモノクローナル抗体のイムノグロブリンクラスおよびサブクラス) 実施例2で得られた中和活性能のある抗PTHrPモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株が産生する抗PTHrPモノクローナル抗体のイムノグロブリンクラスおよびサブクラスについて検討した。イムノグロブリンクラスおよびサブクラスの検討は、免疫グロブリンサブクラスボリクローナル抗体を用い、実施例2で用いた酵素抗体法に従って行った。代表例としてPTHrP(1-34)由来およびrPTHrP由来の各々5株、計10株の結果を表1に示す。

【0056】

【表1】

ハイブリドーマ (株名)	サブクラスポリクローナル抗体との反応性				
	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM
EVO34B1G	+				
EVO34B2AG		+			
EVO34B4M					+
EVO34B2BG			+		
EVO34B3G				+	
EVO1411G	+				
EVO1413G				+	
EVO1412AG		+			
EVO141M					+
EVO1412BG			+		

【0057】【実施例4】(抗PTHrPモノクローナル抗体の調製) 実施例3のハイブリドーマクローン10株の細胞を各々、2週間前にプリスタン0.5mlを腹腔内投与した10~12週令Balb/cマウスの腹腔内に、 5×10^6 個/匹の割合で接種した。腹水が充分に生産された後、この腹水を回収した。腹水中のモノクローナル抗体は、硫酸塩析し、さらに10mMリン酸二水素カリウム (pH6.0) で透析した後、ペーカーボンドABXカラム (J. T. ペーカー社製) を用いて250mMリン酸二水素カリウム (pH6.8) のグラジエントにより精製した。得られた抗PTHrPモノクローナル抗体は20.5~58.7mgであった。

【0058】【実施例5】(抗PTHrPモノクローナル抗体の高カルシウム血症動物モデルでの特性) 実施例4で得られた抗PTHrPモノクローナル抗体の高カルシウム血症動物モデルでの治療・予防効果を、浸透圧ポンプ (アルザ社製; モデル2002) を用いた系で検討した。まず、浸透圧ポンプに1%牛血清アルブミンを含む生理食塩水に溶解させたrPTHrP (1.75mg/ml) 200 μ lを充填し、その浸透圧ポンプを10週令のBalb/cマウスの腹腔内に埋め込み、2日毎に尾静脈より血液を50 μ lずつ採取し、血清中のCaレベルを原子吸光度計 (日立製作所: モデルZ6100) を用いて測定した。

【0059】予備実験で浸透圧ポンプをマウス生体内に埋め込んだ後、約5~6日目まで血清中のCaレベルが19~20mg/dlになることが判明したので、浸透圧ポンプを埋め込んでから6日目に、実施例4で精製した抗PTHrPモノクローナル抗体300 μ gをマウス尾静脈内へ投与してその効果を検討した。その結果を図1に示す。図1に示すように、実施例4で得られた精製抗PTHrPモノクローナル抗体は高カルシウム血症治療・予防剤として有効であることが判明した。

【0060】【実施例6】(抗PTHrPモノクローナル抗体のF(ab')₂断片の調製) 0.05Mクエン酸ナトリウム/0.15M NaCl (pH4.0) の緩衝液に実施例4で得られた精製抗PTHrPモノクローナル抗体を溶解させ、これをペプシン (シグマ社製) を用いて37℃で5分間消化した。上記ペプシンは該抗PTHrPモノクローナル抗体の35分の1重量の量を使用した。次いで、3M トリス (pH8.6) を1/3容量添加して反応を停止させた。

【0061】消化物を10mM リン酸二水素カリウム (pH6.0) で透析した後、ペーカーボンドABXカラム (J. T. ペーカー社製) を用いて、250mMリン酸二水素カリウム (pH6.8) のグラジエントによるイオン交換クロマトグラフィーを行い、精製F(ab')₂断片を回収した。非還元条件下でのSDS-PAGEゲル電気泳動により検討したところ、分子量122,000ダルトンの単一バンドが得られた。

【0062】このF(ab')₂断片精製物は、酵素抗体法、アデニレートサイクレース促進活性の阻害活性および高カルシウム血症動物モデルにおいて、消化前のIgGと同一の特異性および反応性を有していることが確認された。

【0063】【実施例7】(抗PTHrPモノクローナル抗体産生ハイブリドーマからの該モノクローナル抗体可変部領域遺伝子 [VDJ_H (H鎖) およびVJ_L (L鎖)] の単離) 以下のように、抗PTHrPモノクローナル抗体産生ハイブリドーマからmRNAを単離しcDNAを合成後、PCR (ポリメラーゼチェーンリアクション) 法を用いて、VDJ_H遺伝子およびVJ_L遺伝子のクローニングを行った。

【0064】7-1. 全RNAの抽出

ハイブリドーマ細胞EVO34B1Gの培養液を遠心分離 (1200rpm) にかけて、該ハイブリドーマ細胞を約 3×10^6 個得た。これを、リン酸緩衝生理食塩水 (以下PBSと略す) で洗浄し、この細胞からトータルRNAセパレーター (クローンテック社製) を用いて全RNAを抽出した。その方法は添付されたプロトコールに従った。得られたRNAをトリス-EDTA緩衝液 (以下TEと略す) (pH7.5) に溶解させて全RNAサンプルとした。

【0065】7-2. mRNAの精製

上記7-1項で抽出した全RNAからのmRNAの精製は、オリゴデックス-dt30 (宝酒造社製) を用いて行った。方法は添付されたプロトコールに従い、フェノールで抽出して、エタノール沈殿後、TEに溶解させて、mRNAサンプルを得た。

【0066】7-3. cDNAの合成

可変部領域の遺伝子 (VDJ_HおよびVJ_L) をPCR法によってクローニングするため、7-2項で得られたm

RNAからcDNAを合成した。合成はcDNA合成試薬(ファルマシア社製)を使用し、付属のプロトコールに従った。このプロトコールはGubler, U. ら (Gene, 25巻, 263頁(1983)), Hanahan, D. (DNACloning(Glover, D. M., 編), IRL Press, Oxford, 1巻, 109頁(1985)), Scalenghe, F. ら (Chromosoma 82巻, 205頁(1985)), Okayama, H. ら (Methods in Enzymology 154巻, 3頁(1987))などの文献を参考にしている。得られたcDNAをフェノール/クロロホルムで抽出し、スパンカラムで精製することによりcDNAサンプルを得た。

【0067】7-4. 可変部領域遺伝子(VDJ_HおよびVJ_L)のクローニング

IgGの可変部領域中の保存的なDNA配列を、Kabatらのデータファイル(Sequences of Proteins Immunological Interest, US Dept. of Health and Human Services, US Government Printing Office, (1987))から採用した。このヌクレオチド配列は、成熟タンパク質のアミノ末端から始まるアミノ酸配列をコードしており、このタンパクのシグナル配列は含まない。このDNA配列をもとにし、PCRに用いる次の4種のプライマー(配列番号8~11に塩基配列を示す)を作成した。これらのプライマーは、DNA合成機(アプライドバイオシステムズ社製 Model 381A)にて合成した: VDJ_H 5' 5'-TCTAGATGC AGGT(CT)CAGCT G(AC)AGCAGTC(AT) GG 3' VDJ_H 3' 5'-GGTGTTCTC GAGGTCTAGT GACCGTGGTC CCT(GT)(CG)(GA)CCCC AG 3' VJ_L 5' 5'-CGTGGCTCTA GAAGAAATGT TG(AC)TGACCCA GTCTCCA 3' VJ_L 3' 5'-AACTCGAGCC AGCTTGGTCC C(CA)(CG)C(AT)CCGAA CGTG 3'。

【0068】上記VDJ_H 5' およびVDJ_H 3' またはVJ_L 5' およびVJ_L 3' をプライマーとし、上記cDNAを鋳型として、PCRを行うことにより抗体可変部領域の特異的な配列(H鎖またはL鎖の)が増幅される。PCR法によるDNA増幅についてはErich, H. A. 編 (PCR Technology, Stockton Press(1989))に記載されている。本実施例においては遺伝子増幅試薬(宝酒造社製)を用いて上記PCRを行った。cDNAクローニングに用いた上記プライマーは制限酵素切断部位を有しているので、cDNAクローニングおよび増幅の結果、VDJ_H およびVJ_L のそれぞれ5' 側にXba I 或いは3' 側にXho I が導入される。

【0069】7-5. 可変部領域遺伝子の塩基配列
7-4でクローニングした可変部領域遺伝子の塩基配列をSanger, F. ら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74巻, 5463頁(1977))のジデオキシ法を改変した試薬(東洋紡績社製)を用いて塩基配列を決定した。その結果を配列番号5および配列番号6に示す。さらに、それらの塩基配列から推定されるアミノ酸配列を配列番号3および配列番号4に示す。

【0070】【実施例8】(ヒト免疫グロブリン定常部領域遺伝子(C γ 1(H鎖) および、C κ (L鎖))の

クローニング) マウス/ヒトキメラモノクローナル抗体を作成するために必要なヒトのC γ 1およびC κ をヒト免疫グロブリン産生癌細胞ARH-77からクローニングした。

【0071】8-1. 染色体DNAの分離

ヒト免疫グロブリン産生癌細胞ARH-77(ATCC CRL-1621)を、10%牛胎児血清(以下FCSと略する、大日本製薬社製)を含むRPMI 1640培地(大日本製薬社製)で培養した。得られた細胞をPBSで洗浄し、TNE溶液[10mM Tris-HCl(pH7.5), 0.1M NaCl, 1mM EDTA]に均一に懸濁した。そこに、プロテイナーゼK(ペーリンガー社製)を、最終濃度が0.1mg/mlになるように、そしてSDSを、その最終濃度が0.3%になるようにそれぞれを加えて攪拌後、60℃に4時間保った。等量のフェノールを加えて2時間攪拌した後、3000rpmで、10分間遠心分離して水層を回収し、もう1度フェノール抽出を繰り返した。水層に等量のクロロホルムを加えて緩やかに浸漬後、3000rpmで、5分間遠心分離した。これに0.1容量の3M酢酸ナトリウムおよび等容量のイソプロパノールを加えて、繊維状になった染色体DNAをガラス棒に巻き取り、エタノールで洗浄した後、風乾し、適当量のTEに溶解した。10分間煮沸した1mg/mlのRNaseを1/50量加えて1時間37℃でインキュベートした後、再びフェノール抽出、エタノール沈澱を行って精製した。最終的にTEに溶解することにより染色体DNAを約3mg得た。

【0072】8-2. C γ 1を含むDNA断片およびC κ を含むDNA断片の調製

8-1項で得られた染色体DNAを、次のように制限酵素で完全分解した後、アガロースゲル電気泳動で分子量分画した。まず、染色体DNA 300 μ gを10mM Tris-HCl(pH7.5), 100mM 塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム中で300unitのEcoRIとともに1晩37℃に保持し、完全切断した。これをフェノール抽出し、エタノール沈澱後、TEに溶解させた。このサンプルを0.75%アガロース電気泳動で、100Vで、3時間泳動後、同時に泳動した分子量マーカーをもとに約2kbおよび約15kbと思われる位置のゲルに切れ込みを入れた。そこにDEAEペーパー(東洋濾紙社製DEAEイオン交換フィルター)を差し込み泳動を続けることで2-4kbおよび15-30kbのDNAをペーパーに吸着させた。目的のDNAを吸着させた後、ゲルからペーパーを取り出し1.5M塩化ナトリウム溶液中でペーパーからDNAを溶出し、フェノール抽出およびエタノール沈澱を行い、TEに溶解させた。このようにしてC γ 1を含むDNA断片またはC κ を含むDNA断片が溶解したTE溶液が得られた。

【0073】8-3. 染色体DNAファージライブラリ

一の調製

8-2項で得られたC γ 1を含むDNA断片(15-30kbのDNA)1 μ gと、EcoRIで切断したラムダクロニングベクターEMBL4(ストラタジーン社製)2.5 μ gとをライゲーション試薬(宝酒造社製)を用い、26℃で10分間反応させて連結した。このようにして、C γ 1を含むDNA断片のクローニングを行った。その後、in vitro パッケージング試薬(ストラタジーン社製)のプロトコールに従ってパッケージングしてH鎖ファージライブラリーとした。

【0074】これとは別に、8-2項で得られたC κ を含むDNA断片(2-4kbのDNA)1 μ gとを、E*

プローブH1(配列番号12に示す)

5' AGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGA 3'

プローブH2(配列番号13に示す)

5' ACTACTACTATGGTATGGACGCTCTGGGGCCAAGGGACCGGTCACCG
TCTCTCA 3'

これらのプローブは、DNA合成機で合成された。これらのプローブはそれぞれARH-77のJ μ 領域およびフレームワーク領域の遺伝子配列である。

※20

プローブL1(配列番号14に示す)

5' ACTGTGGCTGCACCATCTGCTTCATCTTCCGCCATCTGATGAGCAGTT 3'

このプローブもDNA合成機で合成された。この配列はC κ 遺伝子の5'末端側50bpの配列である。プローブの標識は、DNA5'末端標識用試薬(宝酒造社製)を用いて行った。65℃で10分加熱して酵素を失活させた後、セファデックスG-50を詰めたカラム(ファルマシア社製)で精製して使用した。

【0077】8-5. ヒトIgG定常部領域遺伝子のスクリーニング

C γ 1およびC κ 遺伝子のスクリーニングは常法に従ってブランクハイブリダイゼーション法で行った。8-2項で作製したファージライブラリーのうちC γ 1を含むDNAを有する λ EMBL4は大腸菌P2-392株に、C κ を含むDNAを有する λ gt10はNM514株に感染させ、8-4項で作製したプローブとハイブリダイズするブランクをスクリーニングした。その結果、プローブH1およびH2とハイブリダイズする株H1-8、そして、プローブL1とハイブリダイズする株L14-2を得た。それらから得られた挿入断片の塩基配列をジデオキシ法で決定した。タンパク質をコードする部★

プライマーL μ 5' CCTCTAGATGAACCTTCGGGCTCAGCTTGATTACCTTGCTGCTGGTTTAA
AAGTTGTCCAGTGTCCAGTTTCAGTGCAGCAGTCTGGAC 3'

そして得られたDNA断片をpUC19のXbaI-SalI部位にサブクロニングした。

【0080】同様にマウスVJ μ 遺伝子にも次のようにしてシグナル配列を付加した。まず、Anti-CEA MoAbのL鎖シグナル配列に対応する部分を含む遺伝子を合成

プライマーL μ 5' CCTCTAGATGGGCATCAAGATGGAGACACATTCAGGTCTTTGTATACA
TGTTGCTGTGGTTGCTGGTGTGAAGGAGAAATTGTATGACCCAGTCT

*c o R Iで切断したラムダクロニングベクター λ gt10(ストラタジーン社製)2.5 μ gとをライゲーション試薬(宝酒造社製)を用いて、26℃で10分間反応して連結した。このようにC κ を含むDNA断片のクローニングを行った。

【0075】8-4. ヒトIgG定常部遺伝子のプローブの作製

Ellison, J.W.ら(Nucleic Acids Research, 10巻, 4071頁(1982))が明らかにしたARH-77由来のC γ 1の配

10 列から次に示すプローブH1およびプローブH2を設計した。

※【0076】これとは別に、Ellison, J.W. (前出)のC κ 遺伝子から次に示すプローブL1を設計した。

★分の遺伝子は、どちらにおいても既知の配列と一致することを確認した。それぞれの挿入断片を制限酵素HindIIIおよびXbaI、あるいはEcoRIを用いて切り出し、pUC19にサブクロニングし、pUC-C γ 1あるいはpL14-2を得た。

【0078】【実施例9】(キメラ抗体発現ベクターの作製)キメラ抗体発現ベクターは以下のようにして作製した。

【0079】9-1 マウス遺伝子の修飾

7-4項でクローニングしたマウスVDJ μ 遺伝子にはタンパク質の分泌に不可欠なシグナル配列が含まれていない。従って、Cabilly, S.らの報告(Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81巻, 3272頁(1984))にある抗体(Anti-CEA MoAb)のシグナル配列に対応する部分を含む遺伝子を合成し、これをプライマー(プライマーL μ)としてPCRを行った。その結果、該抗体のシグナル配列がVDJ μ 遺伝子に付加されたLVDJ μ 遺伝子を得た。そのプライマーL μ の配列を以下に示す。さらに、配列番号15に示す。

し、これをプライマーとしてPCRを行い、シグナル配列がVJ μ 遺伝子に付加されたLVJ μ 遺伝子を得た。これをpUC19のXbaI-SalI部位にサブクロニングした。プライマーL μ の配列を以下に示す。さらに配列番号16に示す：

【0081】9-2. キメラ抗体発現ベクターの調製
 まず、pSVeSaII (特開昭62-14783) を制限酵素NcoIで切断し、大腸菌内での複製起点 (ori) 及びアンピシリン耐性を付与する約4.7kbの断片を単離した。T4DNAリガーゼを用いてこれを環状化し、pSVeSaII-HindIII (ヨーロッパ特許出願公開No. 0420502) を作成した。これを大腸菌 (E.coli) DH5αに導入して増幅させた。このベクターを図2に示すように、HindIIIで切断、平滑末端化し、pXbaIリンカーを付加し、T4DNAリガーゼで環状化しpSVeXbaIを得た。これを大腸菌DH5αに導入して増幅させた。図2に示すように、このベクターpSVeXbaIにはXbaI認識部位の上流にSV40の複製起点を含む初期プロモーター領域が存在している。次に、実施例8で得られたプラスミドpUC-Cγ1 (ヒトH鎖Cγ1遺伝子を含む制限酵素HindIII+XbaI断片約6kbがサブクロニングされている) からHindIIIとXbaIとでCγ1遺伝子を切り出した。このCγ1遺伝子と、上記9-1項で得られたマウスH鎖のLVJL遺伝子断片と、pSVeXbaIをXbaIで切断したベクターとをT4DNAリガーゼで連結してpSVeH26を構築した。その工程を図2に示す。

【0082】次に、実施例8で得られたpL14-2 (ヒトCκ遺伝子をpUC19にサブクロニングして得られる) の5'末端に近いEcoRI部位のみを部分分解し、さらにpHindIIIリンカーを用いてHindIII部位に変換した (図3参照)。これをEcoRIおよびHindIIIで切断してCκ遺伝子を含む領域を切り出した。次に、pUC19にサブクロニングしたマウスLVJL遺伝子を、XbaI並びにHindIIIで切り出した。上記EcoRI-HindIII断片と、XbaI-HindIII断片と、pSVeXbaIをEcoRIおよびXbaIで切断して得られる断片とを、T4DNAリガーゼで連結して、pSVeL26を作製した (第3図)。pSVeL26は、図3に示すようにmLVJL遺伝子とヒトCκ遺伝子とを有する。

【0083】次に、このpSVeL26のTth111I部位を平滑末端にし、pBamHIリンカーを利用してBamHI認識部位を導入した (図4)。そしてEcoRIおよびBamHIで切断することによってmLVJL遺伝子およびヒトCκ遺伝子を含む断片を切り出した。得られた断片とpSVeH26をBamHIおよびEcoRIで切断して得られる断片とをT4DNAリガーゼを用いて連結することにより、キメラ抗体発現ベクターであるpSVeHL26を得た。上記工程を図4に示す。

【0084】このキメラ抗体発現ベクターを動物細胞へ導入することも考慮し、次のようにして、このベクターに

薬剤耐性遺伝子を導入した。まず、Yamashita, K. らのpSVeLTdh (Agric. Biol. Chem., 54巻, 2801頁(1990)) のTth111I部位をBamHI認識部位に変換し、BamHIで切断することによって大腸菌キサンチン・グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Eco-gpt) およびジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) の、それぞれ発現ユニットを含む遺伝子をBamHI断片として単離した (図5)。この遺伝子断片をpSVeHL26のBamHI部位へ挿入、連結してpSVeH26-DMを得た。この工程を図5に示す。

【0085】[実施例10] (キメラ抗体発現ベクターの動物細胞への導入および選択) 実施例9-2で作製したpSVeHL26-DMをマウス骨髓腫細胞株、あるいはハムスター細胞株に導入した。

【0086】10-1. マウス骨髓腫細胞への遺伝子導入

マウス骨髓腫細胞である、FO細胞に、DEAE-デキストラン法で発現ベクターを導入した。上記方法は、高井ら (高井俊行、細胞工学、9巻, 652頁(1990)) に従った。形質転換株の選択は、10% FCSを含むダルベッコ改良イーグルMEM培地 (DMEM) にセレクション試薬 (最終濃度: 200μg/ml キサンチン、5μg/ml アデニン、5μg/ml チミジン、2.5μg/ml ミコフェノール酸、0.1μg/ml アミノプテリン) を加えた培地で行った。

【0087】得られた形質転換株の抗体産生量を、次のようにELISA法で測定した。まず、96穴プレートに抗ヒトIgGを入れて4℃で1晩コートした後、0.05% Tween 20を含むPBSで洗浄した。次に1%ゼラチンを含むPBSで非特異的反応をブロックした。上記形質転換株の培養上清を各ウェルに入れて37℃に1時間保ち、0.05% Tween 20を含むPBSで洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体 (抗ヒトIgG Fc断片、あるいは抗ヒトIgG κ鎖) を加えて37℃で1時間インキュベートした。その後、発色液 (0.04% o-フェニレンジアミン、0.033% 過酸化水素、25mM クエン酸、50mM リン酸水素2ナトリウム (pH5.0)) を加えた。20分後に、4N 硫酸を添加することで反応を停止し、492nmの吸光度を測定して、精製ヒト抗体を標準として生産量を決定した。その結果、表2にその代表例を示すように、抗体を発現している細胞が得られた。これらの株の産生するキメラ抗体を用い、実施例2に従ってPTHrPに対する結合能および中和能を調べたところ、マウスモノクローナル抗体の場合といずれも同等の結果が得られた。

【0088】10-2. ハムスター細胞への遺伝子導入
 ハムスター細胞であるチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞 (ATCC CCL-61) (市販されている) にCheu, C. ら (Mol. Cell. Biol., 7巻, 2745頁(1987))

21

に従って、リン酸カルシウム法で発現ベクターを導入した。形質転換株の選択は、10%FCSを含むDMEMにセレクション試薬（最終濃度：200 μ g/mlキサンチン、5 μ g/mlアデニン、5 μ g/mlチミジン、25 μ g/mlニコフェノール酸、0.1 μ g/mlアミノプテリン）を加えた培地で培養して行った。得られた形質転換株の抗体産生量を、10-1項と同様にELISA法で測定した。抗体を産生する株の代表例を表2に示す。これらの株の産生するキメラ抗体を用い、実施例2に従ってPTHrPに対する結合能および中和

能を調べたところ、マウスモノクローナル抗体の場合と*

宿主細胞	形質転換体株名	MTX濃度 [nM]	抗体生産量 [μ g/ml]
FO	F26-01	0	1.11
	F26-02	0	0.75
	F26-03	0	0.89
	F26-04	0	1.50
	F26-05	0	1.02
	F26-50	50	0.32
	F26-51	50	1.67
	F26-101	100	1.73
	F26-102	100	3.88
	F26-103	100	5.21
CHO	C26-01	0	0.03
	C26-02	0	0.06
	C26-03	0	0.02
	C26-50	50	0.29
	C26-51	50	0.52
	C26-101	100	0.10
	C26-102	100	1.32
	C26-201	200	1.44
	C26-202	200	1.51
	C26-203	200	0.78
	C26-204	200	1.20

【0091】10-4 形質転換細胞の培養および抗体の精製

実施例10-3で得られた細胞のうち抗体生産量の高いF26-102株およびF26-103株について、それぞれ培養を行った。培養は、イスコフ改変ダルベッコ培地（IMDM）に5 μ g/mlトランスフェリンと1mg/mlBSAを添加した無血清培地で行った。5%CO₂下で37℃にて5日間培養して、約4リットルの培養上清を得た。この培養上清からの抗体の精製は実施例4と同様に行い、キメラ抗体をそれぞれ約12mg得た。

【0092】【実施例11】（キメラ抗体の高カルシウム血症動物モデルでの特性）実施例10-4で精製したキメラ抗体を用いて実施例5と同様に高カルシウム血症動物モデルでの治療および予防効果を測定した。その結果、キメラ抗体はマウスモノクローナル抗体と同程度の効果があり、高カルシウム血症の治療・予防剤として非常に有効であることが明らかになった。

【0093】さらに、PTHrPを産生する前立腺癌細胞PC-3（大日本製薬より購入）をヌードマウスに移植し、血中カルシウムレベルが18~20mg/dlになった時点で、実施例4または10-4で調製した抗体をそれぞれ300 μ g尾静脈より投与（各n=5）し、高カルシウム血症治療・予防効果を検討した。その結

*いずれも同等の結果が得られた。

【0089】10-3. キメラ抗体産生細胞の育種

上記10-1項および10-2項で得られたキメラ抗体発現ベクターを含む形質転換株を、50nMから200nMのメソトレキセート（MTX 武田薬品工業社製）を含む培地で約1週間培養を続け、MTX耐性を示す株（DHFR遺伝子を有する株）を分離した。その結果得られた株の代表例を表2に示す。

【0090】

【表2】

果、各抗体投与区のマウスはすべて生存しており、1週間以上にわたり正常カルシウムレベルが維持された。これに対して、対照区のマウスのカルシウムレベルは18~20mg/dlと不変であり、平均3~4日後にはほとんどのマウスが死亡した。

【0094】

【発明の効果】本発明によれば、このように抗ヒト副甲状腺ホルモン関連タンパクモノクローナル抗体またはそれらのフラグメントを含む高カルシウム血症治療・予防剤が得られる。これを用いると、従来の抗血清あるいはポリクローナル抗体を用いた方法に比べ、高成績でかつ比較的長期間にわたり高カルシウム血症を治療することが可能となる。

【0095】さらに、本発明においては、上記抗体の可変部領域の配列を解明させた。これを利用して、遺伝子操作の技術により、ヒト副甲状腺ホルモン関連タンパクを認識するげっ歯類/ヒトキメラモノクローナル抗体が調製される。これを主成分とする高カルシウム血症予防・治療剤を投与するとアレルギー反応がより低くおさえられるため、十分な治療効果が得られる。

【0096】

【配列表】

【0097】

【配列番号：1】配列の長さ：98

(13)

特開平4-228089

23

24

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

フラグメント型：中間部フラグメント

配列の特徴

* 特徴を決定した方法：E

配列

Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala
 1 5 10 15
 Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Phe Met Asn Trp Val Met Gln Ser
 20 25 30
 His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asn Pro Tyr Asn Gly
 35 40 45
 Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val
 50 55 60
 Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala His Met Glu Leu Arg Ser Leu Ala Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Val Thr Thr Glu
 85 90 95
 Phe Gly
 98

【0098】

【配列番号：2】配列の長さ：92

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

20※配列の種類：タンパク質

フラグメント型：中間部フラグメント

配列の特徴

※ 特徴を決定した方法：E

配列

Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg
 1 5 10 15
 Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp
 20 25 30
 Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val
 35 40 45
 Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu
 65 70 75 80
 Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro
 85 90 92

【0099】

【配列番号：3】配列の長さ：116

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

フラグメント型：中間部フラグメント

40 配列の特徴

特徴を決定した方法：E

配列

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly
 20 25 30
 Tyr Phe Met Asn Trp Val Met Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Arg Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys
 50 55 60

(14)

特開平4-228089

25 26
 Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
 65 70 75 80
 His Met Glu Leu Arg Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Gly Gly Val Thr Thr Glu Phe Gly Tyr Trp Gly Pro Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr
 115

【0100】

10*配列の種類：タンパク質

【配列番号：4】配列の長さ：113

フラグメント型：中間部フラグメント

配列の型：アミノ酸

配列の特徴

トポロジー：直鎖状

* 特徴を決定した方法：E

配列

Leu Glu Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser
 1 5 10 15
 Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val
 20 25 30
 His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly
 35 40 45
 Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 65 70 75 80
 Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe
 85 90 95
 Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Ala
 100 105 110
 Arg
 113

【0101】

※トポロジー：直鎖状

【配列番号：5】配列の長さ：356

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の型：核酸

フラグメント型：中間部フラグメント

鎖の数：二本鎖

※

配列

TCTAGA ATG CAG GTT CAG CTG CAG CAG TCT GGA CCT GAG CTG GTG AAG CCT 51
 GGG GCT TCA GTG AAG ATA TCC TGC AAG GCT TCT GGT TAC TCA TTT ACT 99
 GGC TAC TTT ATG AAC TGG GTG ATG CAG AGC CAT GGA AAG AGC CTT GAG 147
 TGG ATT GGA CGT ATT AAT CCT TAC AAT GGT GAT ACT TTC TAC AAC CAG 195
 AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GTA GAC AAA TCC TCT AGC ACA 243
 GCC CAC ATG GAG CTC CGG AGC CTG GCA TCT GAG GAC TCT GCA GTC TAT 291
 TAT TGT GCA AGA GGG GGG GTT ACG ACG GAG TTT GGT TAC TGG GGT CCA 339
 GGG ACC ACG GTC ACT AG 356

【0102】

トポロジー：直鎖状

【配列番号：6】配列の長さ：341

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の型：核酸

フラグメント型：中間部フラグメント

鎖の数：二本鎖

配列

(15)

特開平4-228089

27 28
 T CTA GAA GAA ATT GTG ATG ACC CAG TCT CCA CTC TCC CTG CCT GTC AGT 49
 CTT GGA GAT CAA GCC TCC ATC TCT TGC AGA TCT AGT CAG AGC ATT GTA 97
 CAT AGT AAT GGA AAC ACC TAT TTA GAA TGG TAC CTG CAG AAA CCA GGC 145
 CAG TCT CCA AAG CTC CTG ATC TAC AAA GTT TCC AAC CGA TTT TCT GGG 199
 GTC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA GAT TTC ACA CTC 241
 AAG ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT CTG GGA GTT TAT TAC TGC TTT 289
 CAA GGT TCA CAT GTT CCG TAC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GCT 337
 CGA G 341

【0103】

10 * 配列の種類：ペプチド

【配列番号：7】配列の長さ：34

フラグメント型：中間部フラグメント

配列の型：アミノ酸

配列の特徴

トポロジー：直鎖状

* 特徴を決定した方法：S

配列

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His
 Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln
 1 5
 10 15
 Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His
 His Leu Ile Ala Glu Ile His
 20 25
 30
 Thr Ala
 34

【0104】

※鎖の数：一本鎖

【配列番号：8】配列の長さ：32

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

※ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TCTAGAATGC AGGTYCAGCT GMAGCAGTCW GG
 32

【0105】

★鎖の数：一本鎖

【配列番号：9】配列の長さ：42

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

★ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGTGTCTCTC GAGGTCTAGT GACCGTGGTC CCTKSRCCTC AG 42

【0106】

☆鎖の数：一本鎖

【配列番号：10】配列の長さ：37

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

☆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CGTGGCTCTA GAAGAAATTG TGMTGACCCA GTC
 TCCA 37

【0107】

◆鎖の数：一本鎖

【配列番号：11】配列の長さ：34

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

◆ 配列の種類：合成DNA

配列

AACTCGAGCC AGCTTGGTCC CMSCWCCGAA CGT
 G 34

【0108】

配列の型：核酸

【配列番号：12】配列の長さ：48

50 鎖の数：一本鎖

29

30

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AGGTGCAGCT ACAGCAGTGG GCGCAGGAC TGGTGAAGCC TTCGGAGA

48

【0109】

*鎖の数：一本鎖

【配列番号：13】配列の長さ：66

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

* 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ACTACTACTA TGGTATGGAC GTCTGGGGCC AAG
GGACCAC GGTCACCGTC TCCTCA 66

【0110】

※鎖の数：一本鎖

【配列番号：14】配列の長さ：50

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

※ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ACTGTGGCTG CACCATCTGT CTTTCATCTTC CCG
CCATCTG ATGAGCAGTT 50

【0111】

★鎖の数：一本鎖

【配列番号：15】配列の長さ：89

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

★ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCTCTAGATG AACTTCGGGC TCAGCTTGAT TTACCTTGTC CTGGTTTAA AAGTTGTCCA 60
GTGTCAGTT CAGCTGCAGC AGTCTGGAC 89

【0112】

☆鎖の数：一本鎖

【配列番号：16】配列の長さ：109

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

☆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCTCTAGATG GGCATCAAGA TGGAGACACA TTTCAGGTC TTTGTATACA TGTGCTGTG 60
GTTGCTGGT GTTGAAGGAG AAATTGTGAT GACCCAGTCT CCACTCTCC 109

【図面の簡単な説明】

【図1】高カルシウム血症動物モデルを用いた、抗PTHrPモノクローナル抗体の高カルシウム血症に対する治療・予防効果を示すグラフである。

【図2】本発明のキメラモノクローナル抗体をコードする遺伝子を有する発現ベクターを調製するために用いられるpSVeH26の構築を示す説明図である。

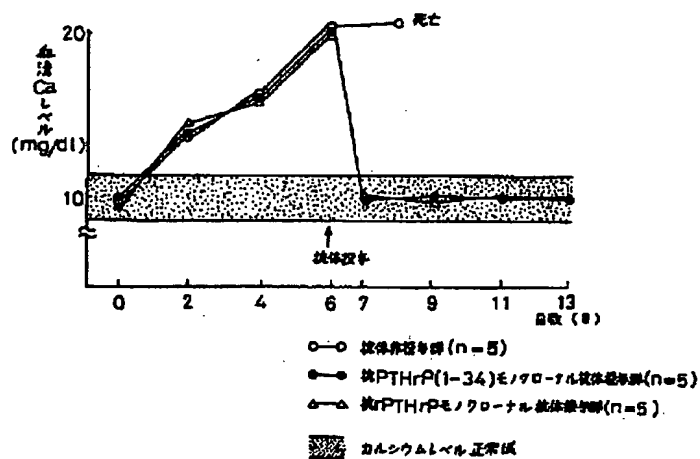
【図3】本発明のキメラモノクローナル抗体をコードす

る遺伝子を有する発現ベクターを調製するために用いられるpSVeL26の構築を示す説明図である。

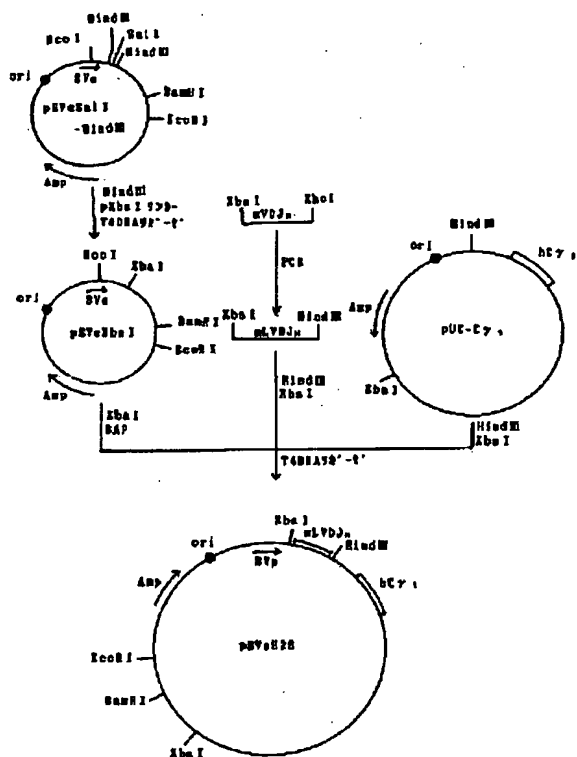
【図4】本発明のキメラモノクローナル抗体をコードする遺伝子を有する発現ベクターであるpSVeHL26の構築を示す説明図である。

【図5】本発明のキメラモノクローナル抗体をコードする遺伝子を有する発現ベクターであるpSVeHL26-DMの構築を示す説明図である。

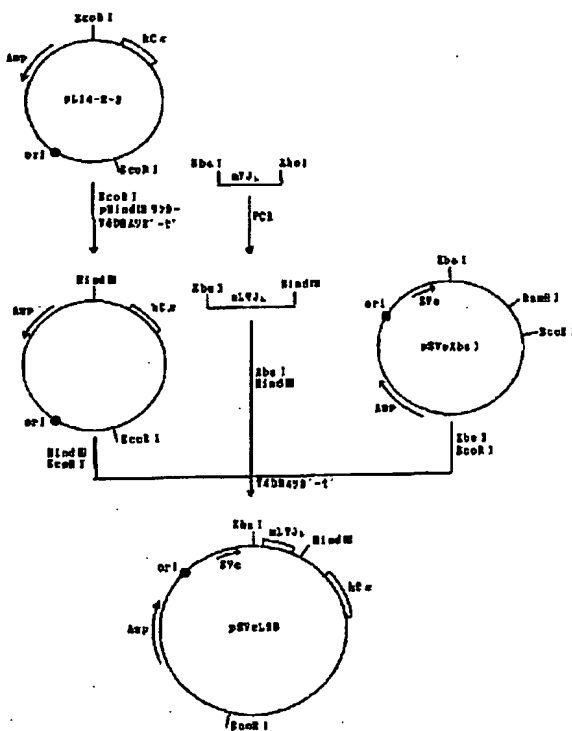
【図1】



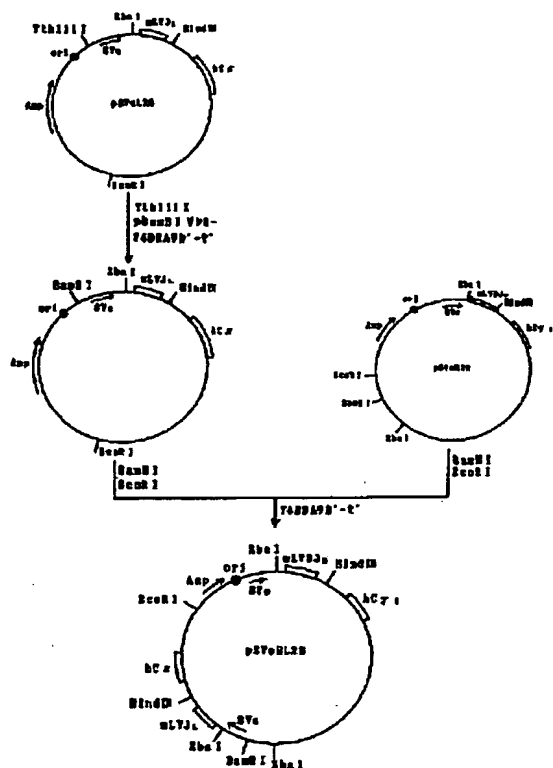
【図2】



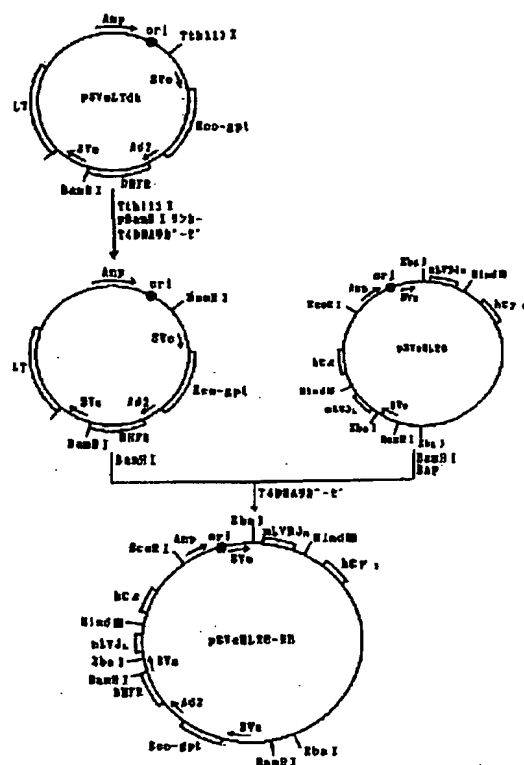
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 N 5/20

15/13

15/62

// C 1 2 N 15/06

(C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1:91)

8828-4B

C 1 2 N 15/00

C

Referenc I

[Title of the invention] THERAPEUTIC AND PREVENTIVE AGENT FOR HYPERCALCEMIA)

[Abstract] (Amended)

[Constitution] A monoclonal antibody having specificity to human parathyroid hormone-related protein (pTHrP) is produced by a hybridoma. The hybridoma is obtained by fusion of an antibody-producing cell, which is derived from an animal immunized with PTHrP or a peptide having the partial sequence thereof, with a myeloma cell. Further, the gene in the variable region of the monoclonal antibody is cloned, and then a rodent/human chimeric monoclonal antibody is produced using the clone.

[Effect] The above monoclonal antibody is useful as a therapeutic and preventive agent for hypercalcemia. The use of the monoclonal antibody of the present invention enables treatment of hypercalcemia with better results and for a relatively longer period of time than methods using standard anti-sera or polyclonal antibodies.

[What is claimed is:]

[Claim 1] A therapeutic and preventive agent for hypercalcemia, which comprises, as an active ingredient, at least one type of a substance selected from the group consisting of an anti-human parathyroid hormone-related protein monoclonal antibody and a substance related thereto.

[Claim 2] The therapeutic and preventive agent of claim 1, which comprises a F(ab') fragment of said monoclonal antibody and/or a peptide comprising the fragment.

[Claim 3] The therapeutic and preventive agent of claim 1, which comprises a monoclonal antibody selected from the group consisting of monoclonal antibodies produced by a hybridoma EVO34BIG or a hybridoma EVO141IG.

[Claim 4] The therapeutic and preventive agent of claim 3, which comprises a F(ab') fragment of said monoclonal antibody and/or a peptide comprising the fragment.

[Claim 5] A gene fragment, which encodes the H-chain variable region of an anti-human parathyroid hormone-related protein monoclonal antibody and comprises, at least as a part thereof, a gene sequence encoding an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1.

[Claim 6] A gene fragment, which encodes the L-chain variable region of an anti-human parathyroid hormone-related protein monoclonal antibody and comprises, at least as a part thereof, a gene sequence encoding an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2.

[Claim 7] An anti-human parathyroid hormone-related protein monoclonal antibody, which comprises, at least as a part of its variable region, the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1.

[Claim 8] An anti-human parathyroid hormone-related protein monoclonal antibody, which comprises, at least as a part of its variable region, the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2.

[Claim 9] A rodent/human chimeric monoclonal antibody or derivative thereof, which comprises a variable region derived from a rodent and a constant region derived from a human and recognizes a human parathyroid hormone-related protein.

[Claim 10] The monoclonal antibody or derivative thereof of claim 9, wherein said chimeric monoclonal antibody has a therapeutic effect on hypercalcemia.

[Claim 11] A fusion gene, which encodes the chimeric monoclonal antibody of claim 9.

[Claim 12] A therapeutic and preventive agent for hypercalcemia, which comprises, as an active ingredient, at least one type of the chimeric monoclonal antibody and derivative thereof of claim 10.

[Claim 13] A cell line, which produces the monoclonal antibody of any one of claims 1, 3, 7, 9 and 11.

[Detailed description of the invention]

[0001]

[Field of industrial application] The present invention relates to an anti-hypercalcemia

agent for treating and preventing hypercalcemia comprising an anti-human parathyroid hormone-related protein monoclonal antibody (hereinafter referred to as an anti-PTHrP monoclonal antibody) as an active ingredient. Particularly, the present invention relates to a therapeutic and preventive agent comprising an anti-PTHrP monoclonal antibody as an active ingredient, which is in the field of medicine used for treating and preventing hypercalcemia, and preventing recurrence of hypercalcemia caused by production of parathyroid hormone-related protein (hereinafter referred to as PTHrP). Further, the present invention relates to a gene fragment encoding the H-chain and a gene fragment encoding the L-chain of the variable region of the above monoclonal antibody; a chimeric monoclonal antibody having the above variable region derived from a rodent and a constant region derived from a human, a therapeutic and preventive agent for hypercalcemia comprising the chimeric monoclonal antibody; and a fusion gene encoding the chimeric monoclonal antibody. Furthermore, the present invention relates to a cell line which produces the above monoclonal antibody.

[0002]

[Prior art] Hypercalcemia is an electrolyte abnormality which is often found in the field of medicine. Hypercalcemia may not only cause a variety of discomfort to patients, but also threaten the life of patients in severe cases. There are various causative diseases of hypercalcemia. An example of a causative disease that causes severe hypercalcemia at high frequency is hyperparathyreosis due to malignancy and excessive production of parathyroid hormone (hereinafter referred to as PTH).

[0003] Hypercalcemia associated with malignancy is largely divided into two cases, based on its developmental mechanism, the case (Local Osteolytic Hypercalcemia) in which hypercalcemia is caused by osteolysis accentuated by the invasion of tumor cells into bones, and the case (Humoral Hypercalcemia of Malignancy, hereinafter referred to as HHM) associated with hypercalcemia caused by generalized action of humoral factors produced by a tumor. A typical example of the former case is hypercalcemia resulting from, for example, bone metastasis resulting from, such as multiple myeloma and breast carcinoma; and a typical example of the latter case (HHM) is hypercalcemia

or the like associated with carcinoma plano cellulare, cancer of kidney to urinary tract system and the like.

[0004] HHM is a paraneoplastic syndrome that occurs at the highest frequency, accounting for 80% or more of hypercalcemia cases associated with malignancy. In many cases, the rapid onset and development of HHM are observed in patients with terminal malignancy. Since no specific treatment for the disease exists, it is a major cause of death of such patients.

[0005] Many researchers have conducted various studies on the causative humoral factors of the onset of HHM. Stewart, A. F. et al have proved the presence of a substance in the blood plasma of a patient with HHM, which shows action, which is analogous, but distinct from that of PTH; and showed that this substance is produced by malignancy cells that cause HHM (Stewart, A. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 80, 1454 (1983); and Goltzman, D. et al., J. Clin. Endocrinol. Metab., vol. 53, 899 (1981)).

[0006] Martin. T. J.'s group isolated a substance having PTH-like activity from the culture supernatant of carcinoma cells (BEN cell) of a lung cancer patient with hypercalcemia and showed the primary structure of the N-terminus of this substance. Further, the group isolated cDNA of the PTH-like substance using mRNA of the cell, and determined the entire primary structure of the precursor of the PTH-like substance (Moseley, J. M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 84, 5048 (1987); and Suva, L. J. et al., Science, vol. 237, 893 (1987)). In their report, the PTH-like substance is called PTHrP, and it comprises 36 signal peptides followed by 141 amino acid residues. It has been also reported that the primary structure of the C-terminus of PTHrP has almost no homology with PTH, but 8 amino acids of those at position 1 to 13 of the N-terminus of PTHrP are identical to those of PTH. The N-terminal portion is thought to be essential for PTH to express its physiological activity, such as a function of PTH to bind to its receptor, and a function of PTH to enhance production of nephrogenic cyclic AMP. Therefore, it is thought that PTHrP has PTH-like activity because it has an N-terminal amino acid structure analogous to that of PTH.

[0007] Horiuchi N. et al have reported that a rat administered with the chemically synthesized peptide (1 to 34) of PTHrP exhibits hypercalcemia (Science, vol. 238, 566 (1987)). Further, Kukreja, S. C. et al have reported that when rabbit anti-sera against PTHrP (1-34) and PTHrP (1-16) peptides were administered to athymic mice (when the mice have exhibited hypercalcemia after implantation of carcinoma cells respectively from a lung cancer patient and a laryngeal cancer patient with hypercalcemia to the mice), a decrease in the blood calcium level to a normal level was observed in some of the athymic mice with hypercalcemia (J. Clin. Invest, vol. 82, 1798 (1988)). As described above, it is known that PTHrP plays an important role as the causative substance of hypercalcemia associated with malignancy.

[0008] Both fluid replacement and furosemide or ethacrynic acid have been used for treating hypercalcemia associated with malignancy. Since they are normally insufficient for therapy, additional administration of calcitonin, mithramycin and the like is required. However, these agents have not yet produced sufficient effect because of their drawbacks such as repetitive administration of calcitonin resulting in decreased effect, and mithramycin causing severe side effect. Therefore, an agent specifically inhibiting PTHrP activity as described above is preferred in the treatment of hypercalcemia associated with malignancy. An example of a method which specifically suppresses only PTHrP activity is Kukreja, S. C. et al's research above. However, the method has drawbacks including poor treatment results and a very brief period of effectiveness even in effective cases because of the use of rabbit anti-sera or polyclonal antibodies obtained by purification of the anti-sera.

[0009]

[Problems to be solved by the invention] The present invention addresses the above-mentioned conventional problems. The purpose of the present invention is to provide an effective therapeutic and preventive agent for hypercalcemia. Another purpose of the present invention is to provide an effective agent for treating and preventing hypercalcemia associated with malignancy.

[0010]

[Measures to solve the problems] As a result of thorough studies to address the problems described above, we have completed the invention by succeeding in obtaining a monoclonal antibody having specificity to human PTHrP, and finding that hypercalcemia can be treated with good results for a relatively long period of time using the monoclonal antibody.

[0011] The agent of the present invention for treating and preventing hypercalcemia comprises, as an active ingredient, at least one type of substance selected from the group consisting of an anti-human parathyroid hormone-related protein monoclonal antibody and the substance related thereto, thereby achieving the above-stated goal.

[0012] The present invention encompasses a gene fragment, which encodes the H-chain variable region of an anti-human parathyroid hormone-related protein monoclonal antibody, and comprises, at least as a part thereof, a gene sequence encoding an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1.

[0013] The present invention encompasses a gene fragment, which encodes the L-chain variable region of an anti-human parathyroid hormone-related protein monoclonal antibody and comprises, at least as a part thereof, a gene sequence encoding an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2.

[0014] The present invention encompasses an anti-human parathyroid hormone-related protein monoclonal antibody, which comprises, at least as a part of its variable region, the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1.

[0015] The present invention encompasses an anti-human parathyroid hormone-related protein monoclonal antibody, which comprises, at least as a part of its variable region, the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2.

[0016] The present invention encompasses a rodent/human chimeric monoclonal antibody and derivative thereof, which comprises a variable region derived from a rodent and a constant region derived from a human and recognizes a human parathyroid hormone-related protein.

[0017] The present invention encompasses a fusion gene, which encodes the above chimeric monoclonal antibody.

[0018] The present invention encompasses a therapeutic and preventive agent for hypercalcemia, which comprises, as an active ingredient, at least one type of the above chimeric monoclonal antibody or derivative thereof.

[0019] The present invention encompasses a cell line, which produces the above monoclonal antibodies.

[0020] To prepare the monoclonal antibody of the present invention, standard techniques for preparing monoclonal antibodies can be used. That is, the monoclonal antibody of the present invention is prepared by preparing a hybridoma by fusion of an antibody-producing cell obtained from an animal immunized with an antigen and a myeloma cell, and then by selecting a clone which produces an antibody specifically inhibiting PTHrP activity from the obtained hybridomas.

[0021] Examples of an antigen that can be used in the above immunization include the entire amino acid sequence of PTHrP or a peptide comprising a partial sequence of PTHrP, which has been prepared by a recombinant DNA method or a chemical synthetic method, and a PTHrP derived from the culture supernatant solution of carcinoma cells that have caused hypercalcemia. An example of a peptide comprising part of the amino acid sequence of PTHrP is a peptide which is located at the N-terminal portion of PTHrP and comprises the following sequence (shown in SEQ ID NO: 7): Ala-Val-Ser-Glu-His-Gln-Leu-Leu-His-Asp-Lys-Gly-Lys-Ser-Ile-Gln-Asp-Leu-Arg-Arg-Arg-Phe-Phe-Leu-His-His-Leu-Ile-Ala-Glu-Ile-His-Thr-Ala. Examples of an antibody-producing cell that can be used herein include B lymphocytes which are derived from spleen cells or lymph node cells of an animal or a human immunized in vivo or in vitro with a peptide (a substance having equivalent action) corresponding to PTHrP or a part thereof, or B lymphocytes which are derived from peripheral blood of a patient.

[0022] Examples of a myeloma cell that can be used for cell fusion include those derived from a mouse, rat, human or other animal. Cell fusion can be performed, for example, by a method using polyethylene glycol (see Tatsuo IWASAKI et al., "Monoclonal antibody, Hybridoma and ELISA," Kodansha (1983)). Hybridomas

obtained by cell fusion are screened (e.g., Enzyme antibody technique), thereby selecting hybridomas which produce antibodies. The resulting antibody-producing hybridomas are cloned (e.g., by a limiting dilution method). The obtained clones are then screened, and clones producing target monoclonal antibodies are selected. For example, screening is performed based on the fact that addition of PTHrP to rat osteoblastic cells, ROS17/2.8 cells or UMR106 cells, improves adenylate cyclase activity, that is, adenylate cyclase activation activity is obtained, while the activity is inhibited when anti-PTHrP monoclonal antibodies are present.

[0023] Two types of resulting hybridoma, EV034B1G and EV01411G, were deposited as Accession numbers of the deposit: 11429 (FERM P-11429) and 11430 (FERM P-11430), respectively, to the Patent and Bio-Resource Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology. EV034B1G has been prepared using a peptide comprising amino acid residues (1-34) of PTHrP as an antigen, and is a hybridoma clone producing an antibody of interest. EV01411G has been prepared using PTHrP obtained by a recombinant DNA method(hereinafter referred to as rPTHrP) as an antigen, and is a hybridoma clone producing an antibody of interest.

[0024] An amount of anti-PTHrP monoclonal antibody produced by the obtained hybridoma can be verified by culturing the hybridoma, and measuring the antibody titer in the culture supernatant by, for example, an enzyme antibody technique. Anti-PTHrP monoclonal antibody is obtained from the resulting hybridoma by, for example, culturing the hybridoma, and sampling the antibody from the culture supernatant by an appropriate method; or by implanting the hybridoma intraperitoneally to a mouse pre-treated with pristine to proliferate, and sampling antibodies from the ascites fluid of the mouse. Anti-PTHrP monoclonal antibodies can also be prepared by the recombinant DNA technique using animal cells or microorganisms. The antibodies above can be purified by a combination of standard biochemical techniques. For example, purification can be performed by an appropriate combination of an ammonium sulfate fractionation method, ion exchange chromatography, gel filtration, PEG fractionation method, affinity chromatography, high performance liquid chromatography,

electrophoresis and the like. Purified monoclonal antibodies are formulated by a technique normally employed for formulating biological products. For example, after sterile filtration using a membrane filter or the like, the purified antibodies are freeze-dried together with a stabilizer into a sterile vial.

[0025] The therapeutic and preventive effect on hypercalcemia of the thus obtained anti-PTHrP antibodies is confirmed by an experimental system which involves administering anti-PTHrP monoclonal antibodies to a hypercalcemia model animal and examining whether or not there is a decrease in blood calcium level. Examples of the above hypercalcemia model animal include a hypercalcemia model animal produced by continuous administration of approximately 6 nano-mols per day of, such as a causative PTHrP or PTHrP (1-34) peptide, or a tumor-bearing hypercalcemia model animal produced by implanting human carcinoma cells (e.g., PC-3 cells) which produce PTHrP to a nude mouse. It was confirmed by each of these methods that the anti-PTHrP monoclonal antibody of the present invention lowers blood calcium level to a normal level. Therefore, the anti-PTHrP monoclonal antibody of the present invention is very preferable as a therapeutic and preventive agent for hypercalcemia associated with malignancy and its industrial applicability is very high.

[0026] Further, examples of the therapeutic and preventive agent of the present invention are not limited to the monoclonal antibody itself. A substance related to the antibody, that is, a fragment having the immunological properties of the monoclonal antibody, such as F(ab') fragment, and a formulation comprising a peptide having the fragment can also be used as a therapeutic and preventive agent for hypercalcemia.

[0027] Further, we have studied the antigen recognition site of the above anti-PTHrP monoclonal antibody. That is, we have attempted to identify the gene sequences of the H-chain and L-chain variable regions of the above monoclonal antibody. A gene (VDJ_H) encoding the above H-chain variable region and a gene (VJ_L) encoding the above L-chain variable region can be determined by isolating, as described later, mRNA from the hybridoma producing the monoclonal antibody, synthesizing cDNA, and performing PCR using the cDNA.

[0028] First, total RNA is extracted by general techniques from hybridomas (e.g. the above EVO34BIG or EVO34BIG) producing the monoclonal antibody of the present invention. Next from the extracted total RNA, mRNA is isolated by standard techniques, using, for example, a commercial kit, oligotex-dt 30 (Takara Shuzo). Then, cDNA is synthesized from the obtained mRNA, and is used as a template for PCR.

[0029] Subsequently, a conserved sequence which is present in the variable region of IgG is selected from Kabat et al's data file (Sequences of Proteins Immunological Interest, US Dept. of Health and Human Services, US Government Printing Office (1987)). Primers are designed from the sequence. The above sequence is a DNA sequence corresponding to the region in the vicinity of the amino terminus of a mature protein, and contains no signal sequence. Parts of the sequences are selected as primers used for PCR (the primer sequences are shown in SEQ ID NO: 8 to 11). A nucleotide sequence of a variable region gene, which is obtained by PCR, is determined by, for example, Sanger, F et al's dideoxy method (Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol. 74, 5463 (1977)) or a method modified therefrom.

[0030] The thus obtained DNA sequences are shown in SEQ ID NO: 5 (H-chain) and SEQ ID NO: 6 (L-chain). Based on the sequence of the primer portion, a gene encoding H-chain variable region is shown to comprise a DNA sequence from C at position 34 to T at position 354 of SEQ ID NO: 5. An amino acid sequence, which corresponds to a DNA sequence of interest (without the primer portion), is shown in SEQ ID NO: 1. A gene encoding the L-chain variable region comprises a DNA sequence from C at position 32 to A at position 340 of SEQ ID NO: 6. An amino acid sequence of interest, from which the primer portion corresponding to the DNA sequence is excluded, is shown in SEQ ID NO: 2.

[0031] Anti-PTHrP monoclonal antibodies produced by the above hybridomas, such as EVO34BIG and EVO141IG, are useful as a therapeutic and preventive agent for hypercalcemia. However, administration of these hybridomas to a human for a long period of time may cause an allergy reaction, because they are derived from a mouse, which is a rodent. As described above, the sequences of the variable regions of the

monoclonal antibody are determined. Next, we have attempted to prepare a rodent/human chimeric monoclonal antibody prepared by binding the determined sequence to the constant region of a human antibody.

[0032] A human immunoglobulin constant region gene, (a gene corresponding to H-chain constant region: C γ 1, and a gene corresponding to L-chain constant region: C κ), which is required for the preparation of the rodent/human chimeric monoclonal antibody of the present invention, can be obtained, for example from human immunoglobulin-producing carcinoma cells ARH-77 [available from ATCC, American Type Culture Collection].

First, ARH-77 (ATCC CRL-1621) is cultured, and genomic DNA is obtained from the resulting cells. The genomic DNA is completely denatured using restriction enzymes required to obtain target DNA fragments from the genomic DNA. Then, molecular weight fractionation is performed by agarose gel electrophoresis, thereby obtaining the target DNA fragments (a DNA fragment containing C γ 1 and that containing C κ).

[0033] The thus obtained DNA fragments are incorporated into appropriate cloning vectors, and then DNA libraries are constructed. For example, the DNA fragment containing C γ 1 of a human IgG is cloned into a lambda cloning vector EMBL4 (Stratagene) cleaved with *Eco* RI, thereby constructing a H-chain phage library. Similarly, the DNA fragment containing C κ of a human IgG is cloned into a lambda cloning vector λ gt10 (Stratagene) cleaved with *Eco* RI, thereby constructing a L-chain phage library.

[0034] The thus amplified DNA fragments are screened for target C γ 1 and C κ fragments by a hybridization method using probes. The above probes are prepared based on the sequences of C γ 1 and C κ which have been shown by Ellison J. W. et al (Nucleic Acids Research, vol. 10, 4071 (1982)). For example, two probes (probes H1 and H2, shown in SEQ ID NOS: 12 and 13, respectively) are designed from C γ 1 gene. The probes H1 and H2 are gene sequences corresponding to the J_H region (Kudou A. J. Imm. Vol. 135, 642 (1985)) and the framework region of ARH-77. Further, a probe L1

(shown in SEQ ID NO: 14) is designed from C κ gene.

[0035] Screening for the above human IgG constant region gene is performed by the plaque hybridization method according to standard techniques. First, appropriate strains are infected with each of the above phage libraries, and then screening for plaques hybridizing to the above probes is performed. Next, nucleotide sequencing is performed by the dideoxy method to confirm that a gene of a portion encoding a protein is identical to the previously shown sequence of C γ 1 or C κ . Each of the inserted fragments is cleaved out using appropriate restriction enzymes, followed by subcloning. For example, C γ 1 fragment is cleaved with *Hind* III and *Xba* I, and then subcloned into pUC19, thereby obtaining a vector, pUC-C γ 1 having C γ 1 fragment. Similarly, C κ fragment is cleaved out with *Eco* RI, and then subcloned into pUC19, thereby obtaining a vector, pL14-2 having C κ .

[0036] An expression vector containing a DNA sequence derived from a mouse and encoding the H-chain variable region of the above anti-PTHrP antibody, a DNA sequence derived from a mouse and encoding the L-chain variable region of the anti-PTHrP antibody, and a DNA sequence encoding the H-chain constant region of a human IgG is constructed. Therefore, a chimeric monoclonal antibody having the variable regions of the anti-PTHrP antibody derived from a mouse and the constant region of a human IgG can be produced by a transformant which is obtained by introducing them into an appropriate host.

[0037] To construct the above expression vector, first, the above mouse VDJ_H gene is modified so that a signal sequence essential for secretion of a protein is added. For example, a gene comprising a portion which corresponds to part of the H-chain signal sequence of an anti-PTHrP antibody (Anti-CEA MoAb) reported by Cabilly. S et al (Proc. Natl. Sci. USA., vol. 81, 3272 (1984)) is synthesized. PCR is performed using the synthesized gene as a primer (shown in SEQ ID NO: 15) and the above VDJ_H gene as a template, thereby obtaining a LVDJ_H gene with the signal sequence added thereto. Similarly for a mouse VJ_L gene, a gene comprising a portion which corresponds to part of the L-chain signal sequence of the above Anti-CEA MoAb is synthesized. Then

PCR is performed using the synthesized gene as a primer (shown in SEQ ID NO: 16), thereby obtaining a LVJ_L gene with the signal sequence added thereto.

[0038] An example of a method for preparing the chimeric antibody expression vector of the present invention is as described below.

[0039] First, pSveSalI-*Hind* III (European Patent Application Publication No. 0420502) is cleaved with *Hind* III, and blunt-ended. Then, a pXbaI linker is added, and the product is circularized with T4 DNA ligase, thereby obtaining pSveXbaI (Fig. 2). In this vector, an early promoter region containing the replication origin of SV40 is present upstream of an *Xba* I recognition site. Next, a DNA fragment comprising C γ I gene which has been cleaved from the plasmid pUC-C γ I comprising the above human H-chain C γ I gene; a fragment comprising the above mouse H-chain LVDJ_H gene fragment; and a vector prepared by cleaving pSveXbaI with *Xba* I are ligated so as to construct pSveH26 (see Fig. 2).

[0040] Separately, a fragment comprising C κ gene derived from the vector pL14-2 (as described above), which is obtained by subcloning C κ gene into pUC19; and the cleaved fragment of pSveXbaI are ligated with T4 DNA ligase so as to obtain pSveL26 (Fig. 3).

[0041] A DNA fragment comprising mLVI_L gene and C κ gene derived from the above pSveL26; and a DNA fragment containing mLVDJ_H gene and C γ I gene derived from pSveH26 are ligated so as to construct an expression vector, pSveHL26, comprising these 4 types of genes (Fig. 4). Further, to introduce the expression vector into an animal cell, pSveHL26-DM is constructed by introducing a drug resistance gene appropriate for the expression vector, such as DHFR and Eco-gpt (Fig. 5).

[0042] The thus obtained expression vector is introduced into an appropriate host, for example, a mouse myeloma cell or a hamster cell line. For example, an expression vector can be introduced into a FO cell, a mouse myeloma cell, by a DEAE-dextran method (Toshiyuki TAKAI, Cell Technology, vol. 9, 652 (1990)). Alternatively, an expression vector can be introduced into a hamster cell, a Chinese hamster ovary (CHO) cell (ATCC CCL-61) by a calcium phosphate method (Chen et al., Mol. Cell.

Biol., vol. 7, 2745 (1987)).

[0043] Whether or not an expression vector has been introduced into a host can be examined using a drug resistance marker in the vector. Antibodies produced by the thus obtained transformants are confirmed to be anti-PTHrP monoclonal antibodies by examining binding ability to PTHrP. The amount of antibodies produced can be measured by, for example, the ELISA method. Names of the representative transformants obtained by the method are shown in Table 2 of Example 10 described below.

[0044] These transformants are cultured in appropriate media so that mouse/human chimeric monoclonal antibodies which recognize anti-human parathyroid hormone-related protein are produced. The monoclonal antibody possesses ability equivalent to that of the above monoclonal antibody derived from a mouse, and it can be preferably used as a therapeutic and preventive agent for hypercalcemia. Unlike a monoclonal antibody derived from a mouse, administration of the monoclonal antibody to a human for a long period of time does not cause an allergy reaction.

[0045] In the above construction of a chimeric antibody expression vector by recombination, for example, substitution, deletion, addition or translocation of one or more amino acids of an antibody to be produced can be effected by, mutation of a specific site of the variable region gene of a mouse monoclonal antibody gene. Thus, an antibody can be improved to have a higher specificity and affinity to PTHrP.

[0046]

[Example] The present invention will be described more specifically, with the following examples, but is not limited by these examples.

[0047] [Example 1] (Preparation of rPTHrP) A PTHrP gene was synthesized as follows according to Martin, T. J. et al's method (J. Biol. Chem., vol. 264, 14806 (1989)). The gene was incorporated into *Escherichia coli*, and then the expressed rPTHrP was obtained. The obtained rPTHrP was purified with the anti-PTHrP monoclonal antibody obtained in Example 4 described later.

[0048] First, 8 DNAs, approximately 110mer each in size (all of the DNAs are

portions of DNA of PTHrP (1 to 141)) were synthesized using a DNA synthesizer (Applied Biosystems). Each DNA was purified by high performance liquid chromatography (Shimadzu Corporation) with ODS columns (YMC Co., Ltd.), and then annealing was performed. Then, each DNA fragment was ligated with T4 DNA ligase (Takara Shuzo), thereby obtaining a target PTHrP (1-141) gene. The PTHrP gene is incorporated into a vector pKK233-2 (Pharmacia) so as to obtain an expression vector. The vector was then incorporated into *Escherichia coli* JM105, thereby obtaining a transformant. The rPTHrP-expressing *E. coli* were prepared in large numbers, lysed by ultrasonication, and then rPTHrP was extracted. The rPTHrP extracts were subjected to gel filtration using Sephacryl S-200HR (Pharmacia), thereby fractionating by molecular weight of around 15,000 to 30,000. The fractions were packed and purified in an antibody column, in which CNBr-activated sepharose 4B (Pharmacia) and the anti-PTHrP (1-34) monoclonal antibody obtained by purification in the later described Example 4 had been coupled to each other (5 mg/carrier). The rPTHrP obtained from a single purification was approximately 10 mg.

[0049][Example 2] (Preparation of anti-PTHrP monoclonal antibody-producing hybridoma) 50 µg of PTHrP (1-34) (PEPTIDE INSTITUTE, INC.), which is a peptide being the N-terminal portion of PTHrP, or rPTHrP peptide obtained in Example 1 was mixed with Freund's complete adjuvant, and then 8-to-12 week old Balb/c mice were immunized subcutaneously with the mixture. After the initial immunization, boosting was performed three times in total at intervals of 3 weeks. On day 7, 5, 3, 2 and 1 before cell fusion, the above peptide was administered, 5 µg per mouse, via the caudal vein of the mouse. Then, the mouse spleen was excised, so that immune spleen cells were obtained.

[0050] Next, immune spleen cells and mouse myeloma cells (F0) were mixed at a 2:1 ratio, fused in the presence of polyethylene glycol 1500, and then added in Iscove's modified Dulbecco's media containing 10%FBS. The media were adjusted to achieve 2×10^6 spleen cells/ml, and then apportioned into a 96-well micro plate at a ratio of 0.1 ml/well. On the next day, HAT medium was added at a ratio of 0.1 ml/well, followed

by continuous exchanging of the half of the medium with a new HAT medium every other day. After about 2 weeks, colony formation of hybridomas was observed. The colonies were further cultured in a 24-well plate, so that 420 hybridoma clones derived from PTHrP(1-34) and 617 hybridoma clones derived from rPTHrP were obtained.

[0051] Whether or not anti-PTHrP monoclonal antibodies were produced in the culture supernatant of these hybridoma clones was examined by an enzyme antibody technique as described below. First, a 96-well plate was coated with rPTHrP at a ratio of 100 ng/well, and then the culture supernatant of the hybridomas was added thereto, followed by reaction at 37°C for 1 hour. After washing, peroxidase-labeled anti-mouse IgG+IgM was added. After another washing, o-phenylenediamine solution was added, allowing color development at room temperature for 20 min. 4 N sulfuric acid was added to stop the reaction, and then absorbance was measured at 492 nm.

[0052] The procedures above revealed that the obtained hybridoma clones were 191 hybridoma clones producing anti-PTHrP monoclonal antibody when PTHrP(1-34) was used as an antigen; and 358 hybridoma clones producing anti-PTHrP monoclonal antibody when rPTHrP was used.

[0053] Next, the neutralizing activity of anti-PTHrP monoclonal antibody for rPTHrP was examined using the culture supernatant of these hybridoma clones. According to Gutierrez, G. E. et al.'s method (J. Boil. Chem., vol. 262, 15845 (1987)), measurement was performed using conversion from [H]ATP to [H]cAMP as an index in ROS17/2.8 cells or UMR106 cells which had been allowed to contain [H] adenine as described below. First, ROS17/2.8 cells or UMR106 cells were inoculated, 2.5×10^4 /well, to a 48 multi-well plate, and cultured in DME media supplemented with 10% FBS for 3 days. After removal of the culture solution, the product was washed twice with a Hanks balanced salt solution, and supplemented with new culture media and 1 μ Ci/ml [H] adenin, followed by incubation at 37°C for 2 hours. Further, the cells were washed twice. 50 μ l of a DME medium supplemented with 2% FBS and containing 1 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX; Sigma) was added to the cells, and then incubation was performed at 37°C for 5 min. Then, 25 μ l of hybridoma culture supernatant and 25

μ l of rPTHrP solution (final concentration of 10^{-7} to 10^{-1} M) were added, and then incubation was performed for another 10 min. Subsequently, 1ml of trichloroacetic acid (final concentration of 0.12 M) was added to stop the reaction, and neutralization was performed with 20 μ l of 4 N NaOH. After the synthesized cAMP was isolated by Salomon, Y. et al's method (Anal. Biochem., vol. 58, 541 (1974)), its radioactivity was measured so as to evaluate the neutralizing activity of anti-PTHrP monoclonal antibody to rPTHrP.

[0054] The above procedures revealed that when PTHrP(1-34) was used as an antigen, 108 hybridoma clones, and when rPTHrP was used, 35 hybridoma clones, produced anti-PTHrP monoclonal antibody having rPTHrP neutralizing activity.

[0055][Example 3] (Immunoglobulin class and subclass of anti-PTHrP monoclonal antibody produced by hybridoma) The immunoglobulin class and subclass were examined for anti-PTHrP monoclonal antibody produced by hybridomas which produce anti-PTHrP monoclonal antibody having neutralizing activity obtained in Example 2. Examination of the immunoglobulin class and subclass was performed by the enzyme antibody technique employed in Example 2 using an immunoglobulin subclass polyclonal antibody. The results for a total 10 hybridomas, consisting of 5 hybridomas derived from PTHrP(1-34) and rPTHrP respectively, are shown as typical examples in Table 1.

[0056]

[Table 1]

Hybridoma (name)	Reactivity with subclass polyclonal antibody				
	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM
EVO34BIG	+				
EVO34B2AG		+			
EVO34BM					+
EVO34B2BG			+		
EVO34B3G				+	
EVO141IG	+				
EVO1413G				+	
EVO1412AG		+			
EVO141M					+
EVO1412BG			+		

[0057][Example 4] (Preparation of anti-PTHrP monoclonal antibody) The cells of 10 hybridoma clones in Example 3 were separately inoculated, 5×10^6 cells/mouse, intraperitoneally to 10 to 12 week-old Balb/c mice which had been intraperitoneally administered with 0.5 ml of pristine 2 weeks before. After ascites were produced sufficiently, the ascites were collected. Monoclonal antibodies in the ascites were subjected to salting out with ammonium sulfate, dialysed with 10 mM potassium dihydrogenphosphate (pH 6.0), and then purified by 250 mM potassium dihydrogenphosphate gradient (pH 6.8) using Baker bond ABX column (J. T. Baker). The obtained anti-PTHrP monoclonal antibody was 20.5 to 58.7 mg.

[0058][Example 5] (Properties of anti-PTHrP monoclonal antibody in hypercalcemia model animal) The therapeutic and preventive effect of the anti-PTHrP monoclonal antibody obtained in Example 4 in a hypercalcemia model animal was examined in a system using an osmotic pump (ALZA Corporation; model 2002). First, the osmotic pump was charged with 200 μ l of rPTHrP (1.75 mg/ml) dissolved in physiological saline containing 1% bovine serum albumin. Then the osmotic pump was implanted intraperitoneally in a 10-week old Balb/c mouse. Blood was collected 50 μ l each via the caudal vein every two days, and Ca level in the serum was measured using an atomic absorption spectrophotometer (Hitachi: model Z6100).

[0059] After the osmotic pump was implanted in a mouse in the preliminary experiment, Ca level in the serum was shown to be 19 to 20mg/dl on around day, 5 to 6. Accordingly, on day 6 after implantation of the osmotic pump, 300 μ g of anti-PTHrP monoclonal antibody purified in Example 4 was administered to a mouse via caudal vein, and the effect was examined. Figure 1 shows the result. As shown in Fig. 1, the purified anti-PTHrP monoclonal antibody obtained in Example 4 was shown to be effective as a therapeutic and preventive agent for hypercalcemia.

[0060][Example 6] (Preparation of F(ab') fragment of anti-PTHrP monoclonal antibody) The purified anti-PTHrP monoclonal antibody obtained in Example 4 was dissolved in a buffer (0.05 M sodium citrate/0.15 M NaCl (pH 4.0)), followed by digestion with pepsin (Sigma) at 37°C for 5 min. The weight of the pepsin used as

described above was 1/35 of that of the anti-PTHrP monoclonal antibody. Then, reaction was stopped by addition of a 1/3 volume of 3 M Tris (pH 8.6).

[0061] The digested product was dialysed with 10 mM potassium dihydrogenphosphate (pH 6.0) and then subjected to ion exchange chromatography with a Baker bond ABX column (J. T. Baker) using 250mM potassium dihydrogenphosphate gradient (pH 6.8). Thus, F(ab') fragments were purified and collected. The fragment was examined by SDS-PAGE gel electrophoresis under non-reducing condition, so that a single band of a molecular weight of 122,000 daltons was obtained.

[0062] In the hypercalcemia model animal, the purified F(ab')₂ fragment was confirmed to have specificity and reactivity identical to those of IgG before digestion, based on the results from the enzyme antibody technique, and inhibitory activity against adenylate cyclase activation activity.

[0063][Example 7] (Isolation of variable region genes [VDJ_H (H-chain) and VJ_L (L-chain)] of anti-PTHrP monoclonal antibody from anti-PTHrP monoclonal antibody-producing hybridoma) As described below, mRNA was isolated from anti-PTHrP monoclonal antibody-producing hybridoma, and then cDNA was synthesized. Next, VDJ_H gene and VJ_L gene were cloned by PCR (polymerase chain reaction).

[0064] 7-1. Extraction of total RNA

A hybridoma EVO34BIG culture solution was centrifuged (1200 rpm), so that approximately 3×10^8 cells of the hybridoma were obtained. The hybridoma was washed with phosphate-buffered physiological saline (hereinafter referred to as PBS), and then total RNA was extracted from the cells using a total RNA separator (Clontec). Extraction was performed according to the protocol provided with the system. The obtained RNA was dissolved in Tris-EDTA buffer (hereinafter referred to as TE) (pH 7.5), thereby obtaining a total RNA sample.

[0065] 7-2. Purification of mRNA

mRNA was purified using oligotex-dt30 (Takara Shuzo) from the total RNA extracted in the above Section 7-1. Purification was performed according to the protocol provided with the system. After phenol extraction and ethanol precipitation, the

product was dissolved in TE, thereby obtaining mRNA samples.

[0066] 7-3. Synthesis of cDNA

To clone the variable region genes (VDJ_H and VJ_L) by PCR, cDNA was synthesized from the mRNA obtained in Section 7-2. Synthesis was performed using a cDNA synthesis reagent (Pharmacia) according to the protocol provided therewith. Literature including Gubler, U. et al (Gene, vol. 25, 263 (1983)), Hanahan, D. (DNA Cloning (Glover, D. M., ed.), IRL Press, Oxford, vol. 1, 109 (1985)), Scalenghe, F. et al (Chromosoma vol. 82, 205 (1985)), and Okayama, H. et al., (Methods in Enzymology vol. 154, 3 (1987)) were used for a reference in the protocol. The obtained cDNA was extracted with phenol/chloroform and purified with a spun column, thereby obtaining a cDNA sample.

[0067] 7-4. Cloning of variable region gene (VDJ_H and VJ_L)

A conserved DNA sequence in the variable region of IgG used herein was selected from Kabat et al's data file (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. of Health and Human Services, US Government Printing Office (1987)). The nucleotide sequence encodes an amino acid sequence starting from the amino terminus of a mature protein and contains no signal sequence of the protein. The following four types of primers (the nucleotide sequences are shown in SEQ ID NOS: 8 to 11) to be used for PCR were produced based on the DNA sequence. These primers were synthesized using a DNA synthesizer (Applied Biosystems, Model 381A): VDJ_H5' 5' TCTAGAATGC AGGT(CT)CAGCT G(AC)AGCAGTC(AT) GG 3' VDJ_H3' 5'GGTGTTCTC GAGGTCTAGT GACCGTGGTC CCT(GT)(CG)(GA)CCCC AG 3' VJ_L5' 5'CGTGGCTCTA GAAGAAATTG TG(AC)TGACCCA GTCTCCA 3' VJ_L3' 5'AACTCGAGCC AGCTTGGTCC C(CA)(CG)C(AT)CCGAA CGTG3'.

[0068] PCR was performed using the above VDJ_H5' and VDJ_H3' or VJ_L5' and VJ_L3' as primers and the above cDNA as a template, thereby amplifying the specific sequence (H-chain or L-chain) of the variable region of the antibody. DNA amplification by PCR is described in Erlich, H. A. ed (PCR Technology, Stockton Press (1989)). In this example, the above PCR was performed using a gene amplification reagent (Takara

Shuzo). Since the above primers used in cDNA cloning contain restriction enzyme cleavage sites, cDNA cloning and amplification cause *Xba* I to be introduced onto the 5' side or *Xho* I onto the 3' side of VDJ_H and VJ_L, respectively.

[0069] 7-5. Nucleotide sequence of variable region gene

The nucleotide sequence of the variable region gene cloned in Section 7-4 was determined by a modified method of Sanger, F. et al's dideoxy method (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 74, 5463 (1977)) using a reagent (Toyobo). The results are shown in SEQ ID NOS: 5 and 6. Further, amino acid sequences predicted from these nucleotide sequences are shown in SEQ ID NOS: 3 and 4.

[0070] [Example 8] (Cloning of human immunoglobulin constant region gene (C_γ1 (H-chain) and C_κ (L-chain))) Human C_γ1 and C_κ required for producing a mouse/human chimeric monoclonal antibody were cloned from human immunoglobulin-producing carcinoma cells ARH-77.

[0071] 8-1. Isolation of chromosome DNA

Human immunoglobulin-producing carcinoma cells ARH-77 (ATCC CRL-1621) were cultured in RPMI1640 media (Dainippon Pharmaceutical) containing 10% fetal calf serum (hereinafter referred to as FCS, Dainippon Pharmaceutical). The obtained cells were washed with PBS, and then uniformly suspended in TNE solution [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA]. To the suspension, Proteinase K (Boehringer) was added to a final concentration of 0.1 mg/ml, and then SDS was added to a final concentration of 0.3%. After stirring, the mixture was kept at 60°C for 4 hours. An equivalent volume of phenol was added to the mixture and the mixture was stirred for 2 hours, followed by centrifugation at 3000 rpm for 10 min. The aqueous layer was collected, and another phenol extraction was performed. After addition of an equivalent volume of chloroform to the aqueous layer, the mixture was gently shaken, and then centrifuged at 3000 rpm for 5 min. A 0.1 volume of 3 M sodium acetate and an equivalent volume of isopropanol were added to the product, and then the resulting fiber-shaped chromosome DNA was collected by winding onto a glass rod. The DNA was washed with ethanol, air-dried, and then dissolved in an appropriate volume of TE.

A 1/50 volume of 1 mg/ml RNase boiled for 10min was added to the solution, followed by incubation at 37°C for 1 hour. Phenol extraction and ethanol precipitation were performed again for purification, and the purified product was finally dissolved in TE, thereby obtaining approximately 3mg of chromosome DNA.

[0072] 8-2. Preparation of DNA fragment containing Cyl and DNA fragment containing Ck

The chromosome DNA obtained in Section 8-1 was completely denatured with restriction enzymes as follows and then molecular weight fractionation was performed by agarose gel electrophoresis. First, 300 µg of chromosome DNA was maintained in 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM sodium chloride, and 10 mM magnesium chloride, together with 300 units of *Eco* RI overnight at 37°C, thereby completely cleaving the DNA. The product was subjected to phenol extraction and ethanol precipitation, and then dissolved in TE. The sample was subjected to 0.75% agarose electrophoresis at 100 V for 3 hours, and then incisions were made in the gels at positions thought to correspond to approximately 2 kb and 15 kb (based on a molecular weight marker subjected to electrophoresis at the same time). Then DEAE paper (Toyo Roshi Kaisha, Ltd., DEAE ion exchange filter) was inserted to the incision and electrophoresis was continued, thereby allowing 2 to 4 kb and 15 to 30 kb DNAs to adsorb to the paper. After adsorption of the target DNAs, paper was removed from the gel. The DNAs were eluted from the paper in 1.5 M sodium chloride solution, subjected to phenol extraction and ethanol precipitation, and then dissolved in TE. Thus, the TE solution containing a DNA fragment having Cyl or a DNA fragment having Ck dissolved therein was obtained.

[0073] 8-3. Construction of chromosome DNA phage library

1 µg of the DNA fragment (a 15 to 30 kb DNA) containing Cyl obtained in Section 8-2 and 2.5 µg of lambda cloning vector EMBL4 (Stratagene) cleaved with *Eco* RI were allowed to react and ligate to each other using a ligation reagent (Takara Shuzo) for 10min at 26°C. Thus, the DNA fragment containing Cyl was cloned. Then, packaging was performed according to the protocol of an in vitro packaging reagent

(Stratagene), thereby obtaining a H-chain phage library.

[0074] Separately, 1 µg of the DNA fragment (a 2-4 kb DNA) comprising Cκ obtained in Section 8-2 and 2.5 µg of a lambda cloning vector λgt10 (Stratagene) cleaved with *Eco* RI were allowed to react and ligate using a ligation reagent (Takara Shuzo) for 10 min at 26°C. Thus, the DNA fragment comprising Cκ was cloned.

[0075] 8-4. Preparation of probe for human IgG constant region gene

The following probes H1 and H2 were designed from the sequence of Cγ1 derived from ARH-77 that Ellison, J. W. et al (Nucleic Acids Research, vol. 10, 4071 (1982)) have revealed.

Probe H1 (shown in SEQ ID NO: 12)

5' AGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGA 3'

Probe H2 (shown in SEQ ID NO: 13)

5'

ACTACTACTATGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
CTCA 3'

These probes were synthesized by a DNA synthesizer. These probes were a gene sequence of the J_H region and that of the framework region of ARH-77, respectively.

[0076] Separately, the following probe L1 was designed from Cκ gene of Ellison, J. W.(described above).

Probe L1 (shown in SEQ ID NO: 14)

5' ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTT 3'

The probe was also synthesized by a DNA synthesizer. The sequence is a 50 bp sequence on the 5'terminal side of Cκ gene. The probe was labeled with a reagent for labeling DNA 5' terminus (Takara Shuzo). After the enzyme was deactivated by heating at 65°C for 10min, the product was purified with a column that had been charged with Sephadex G-50 (Pharmacia), and then used.

[0077] 8-5. Screening for human IgG constant region gene

Cγ1 and Cκ genes were screened by a plaque hybridization method according to standard techniques. *Escherichia coli* strains P2-392 and NM514 were infected with

phage libraries λ EMBL4 having DNA comprising C γ 1, and with λ gt10 having DNA comprising C κ of those constructed in Section 8-2. Then, plaques hybridizing to the probes prepared in Section 8-4 were screened. Therefore, a strain H1-8 hybridizing to probes H1 and H2, and a strain L14-2 hybridizing to probe L1 were obtained. The nucleotide sequences of the resulting inserted fragments were determined by a dideoxy method. In both cases, a gene of a portion encoding the protein was confirmed to be identical to a known sequence. Each inserted fragment was cleaved out with restriction enzymes *Hind* III and *Xba* I, or *Eco* RI, subcloned into pUC19, thereby obtaining pUC-C γ 1 or pL14-2.

[0078] [Example 9] (Construction of chimeric antibody expression vector) A chimeric antibody expression vector was constructed as described below.

[0079] 9-1. Modification of a mouse gene

The mouse VDJ_H gene cloned in Section 7-4 contained no signal sequence essential for secretion of a protein. Therefore, a gene comprising a portion corresponding to the signal sequence of an antibody (Anti-CEA MoAb) reported by Cabilly, S. et al (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., vol. 81, 3272 (1984)) was synthesized. Then, PCR was performed using the gene as a primer (primer L_H), thereby obtaining LV_{VDJ_H} gene comprising the signal sequence of the antibody added to VDJ_H gene. The sequence of the primer L_H is as shown below, and is also shown in SEQ ID NO: 15.

Primer	L _H	5'
CCTCTAGATGAACTTCGGGCTCAGCTTGATTACCTTGTCCTGGTTTAAAG		
TTGTCCAGTGTTCAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGAC 3'		

The thus obtained DNA fragment was subcloned into *Xba* I-*Sal* I site of pUC19.

[0080] Similarly, a signal sequence was added to mouse VJ_L gene as described below. First, a gene comprising a portion corresponding to the L-chain signal sequence of Anti-CEA MoAb was synthesized. Then PCR was performed using the gene as a primer, thereby obtaining LVJ_L gene having the signal sequence added to VJ_L gene. The gene was subcloned to *Xba* I-*Sal* I site of pUC19. The sequence of primer L_L is as shown below and is also shown in SEQ ID NO: 16.

Primer

L_L

5'

CCTCTAGATGGGCATCAAGATGGAGACACATTCTCAGGTCTTTGTATACATGT
 TGCTGTGGTTGTCTGGTGTGAAGGAGAAATTGTGATGACCCAGTCTCCACT
 CTCC 3'

[0081] 9-2. Construction of chimeric antibody expression vector

First, pSVeSalI (Japanese Patent Application Laying-Open (kokai) No. 62-14783 was cleaved with a restriction enzyme *Nco* I, thereby isolating an approximately 4.7kb fragment which confers a replication origin (ori) in *Escherichia coli* and ampicillin resistance. T4DNA ligase was used to circularize the fragment, so that pSVeSalI-*Hind* III (European Patent Application Publication No. 0420502) was produced. The vector was introduced and amplified in *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α . As shown in Fig. 2, the vector was cleaved with *Hind* III, blunt-ended, added with pXbaI linker, and then circularized with T4DNA ligase, thereby obtaining pSVeXbaI. The vector was introduced and amplified in *E. coli* DH5 α . As shown in Fig. 2, an early promoter region containing the replication origin of SV40 was located upstream of *Xba* I recognition site in the vector pSVeXbaI. Next, a C γ gene was cleaved out with *Hind* III and *Xba* I from the plasmid pUC-C γ obtained in Example 8 (in which an approximately 6kb restriction enzyme *Hind* III + *Xba* I fragment comprising the human H-chain C γ gene had been subcloned). The C γ gene, the mouse H-chain LVJ_H gene fragment obtained in the above Section 9-1, and a vector obtained by cleaving pSVeXbaI with *Xba* I were ligated with T4DNA ligase, thereby constructing pSVeH26. Figure 2 shows the steps involved.

[0082] Subsequently, only the *Eco* RI site close to the 5' terminus of pL14-2 (obtained by subcloning a human C κ gene into pUC19) obtained in Example 8 was partially denatured, and converted to *Hind* III site using pHindIII linker (see Fig. 3). This was cleaved with *Eco* RI and *Hind* III, so that a region containing the C κ gene was cleaved out. Then, the mouse LVJ_L gene subcloned to pUC19 was cleaved out with *Xba* I and *Hind* III. The above *Eco* RI-*Hind* III fragment, *Xba* I-*Hind* III fragment, and a fragment obtained by cleaving pSVeXbaI with *Eco* RI and *Xba* I were ligated with

T4DNA ligase, thereby constructing pSVeL26 (Fig. 3) which comprises mLVJ_L gene and the human Ck gene as shown in Fig. 3.

[0083] Then, the *Tth111* I site of the pSVeL26 was blunt-ended, and then a *Bam* HI recognition site was introduced using pBamHI linker (Fig. 4). The product was cleaved with *Eco* RI and *Bam* HI, so that a fragment comprising mLVJ_L gene and the human Ck gene was cleaved out. The obtained fragment and a fragment obtained by cleaving pSVeH26 with *Bam* HI and *Eco* RI were ligated using T4DNA ligase, thereby obtaining a chimeric antibody expression vector, pSVeHL26. Figure 4 shows the above steps.

[0084] To introduce the chimeric antibody expression vector into an animal cell, a drug resistance gene was introduced into the vector as described below. First, the *Tth111* I site of Yamashita, K. et al's pSVeLTdh (Agric. Biol. Chem., vol. 54, 2801 (1990)) was converted to a *Bam* HI recognition site, and then cleaved with *Bam* HI, thereby isolating a gene comprising each expression unit of *Escherichia coli* xanthine-guanine phosphoribosyltransferase (Eco-gpt) and dihydrofolate reductase (DHFR) as a *Bam* HI fragment (Fig. 5). The gene fragment was inserted and ligated to *Bam* HI site of pSVeHL26, thereby obtaining pSVeH26-DM. Figure 5 shows the steps involved.

[0085] [Example 10] (Introduction of chimeric antibody expression vector into animal cell and selection thereof) pSVeHL26-DM constructed in Example 9-2 was introduced into a mouse myeloma cell line, or a hamster cell line.

[0086] 10-1. Gene introduction into mouse myeloma cell

An expression vector was introduced into an FO cell, a mouse myeloma cell, by a DEAE-dextran method. Introduction was performed according to Takai et al's method (Toshiyuki TAKAI, Cell Technology, vol. 9, 652 (1990)). Transformants were selected in a Dulbecco's modified Eagle's MEM medium (DMEM) containing 10% FCS and supplemented with a selection reagent (final concentration: 200 µg/ml xanthine, 5 µg/ml adenin, 5 µg/ml thymidine, 2.5 µg/ml mycophenolic acid, 0.1 µg/ml aminopterin).

[0087] The amount of antibody produced by the obtained transformant was measured by ELISA as described below. First, the anti-human IgG was put into and coated over

a 96-well plate at 4°C overnight, and then washed with PBS containing 0.05% Tween 20. Next, nonspecific reaction was blocked with PBS containing 1% gelatin. The culture supernatant of the above transformant was put into each well, maintained at 37°C for 1 hour, washed with PBS containing 0.05% Tween20, and then added with peroxidase-labeled monoclonal antibody (anti-human IgGFc fragment, or anti-human IgGκ-chain), followed by incubation at 37°C for 1 hour. Subsequently, a color reagent (0.04% o-phenylenediamine, 0.033% hydrogen peroxide, 25 mM citric acid, and 50 mM disodium hydrogenphosphate (pH 5.0)) was added. 20 minutes later, 4 N sulfuric acid was added to stop reaction, and then absorbance at 492 nm was measured, thereby determining the production amount with the purified human antibody as a standard. Therefore, as shown by the typical examples in Table 2, cells expressing the antibodies were obtained. Binding ability and neutralizing ability for PTHrP were examined according to Example 2 using chimeric antibodies produced by these transformants. The results for both abilities were equivalent to those of mouse monoclonal antibody.

[0088] 10-2. Gene introduction into hamster cell

An expression vector was introduced into hamster cells, that is, Chinese hamster ovary (CHO) cell (ATCCCL-61) (commercially available) by a calcium phosphate method according to Chen, C. et al (Mol. Cell. Biol., vol. 7, 2745 (1987)). Transformants were selected by culturing the transformants in a DMEM containing 10% FCS and supplemented with a selection reagent (final concentration: 200 µg/ml xanthine, 5 µg/ml adenin, 5 µg/ml thymidine, 25 µg/ml mycophenolic acid, 0.1 µg/ml aminopterin). The amount of the antibody produced by the resulting transformant was measured by ELISA in the same manner as in Section 10-1. Table 2 shows typical examples of transformants producing the antibody. Binding ability and neutralizing ability for PTHrP were examined according to Example 2 using chimeric antibodies produced by these transformants. The results for both abilities were equivalent to those of a mouse monoclonal antibody.

[0089] 10-3. Breeding of chimeric antibody producing cell

The transformant containing the chimeric antibody expression vector obtained in the above Section 10-1 and Section 10-2 was cultured for approximately 1 month in a medium containing 50 nM to 200 nM methotrexate (MTX TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.), thereby isolating transformants (transformants having DHFR gene) showing MTX resistance. Table 2 shows typical examples of the resulting transformants.

[0090]

[Table 2]

Host Cell	Transformant Name	MTX concentration [nM]	Antibody production amount [μ g/ml]
FO	F26-01	0	1.11
	F26-02	0	0.75
	F26-03	0	0.89
	F26-04	0	1.50
	F26-05	0	1.02
	F26-50	50	0.32
	F26-51	50	1.67
	F26-101	100	1.73
	F26-102	100	3.88
	F26-103	100	5.21
CHO	C26-01	0	0.03
	C26-02	0	0.06
	C26-03	0	0.02
	C26-50	50	0.29
	C26-51	50	0.52
	C26-101	100	0.10
	C26-102	100	1.32
	C26-201	200	1.44
	C26-202	200	1.51
	C26-203	200	0.78
	C26-204	200	1.20

[0091] 10-4. Culture of transformant cell and purification of antibody

Among the cells obtained in Example 10-3, transformants F26-102 and F26-103 showing high antibody production amount were cultured separately. Culturing was performed in serum free media which had been prepared by adding 5 μ g/ml transferrin and 1 mg/ml BSA to Iscove's modified Dulbecco's media (IMDM). The cells were cultured in the presence of 5% CO₂ at 37°C for 5 days, so that approximately 4 l of

culture supernatant was obtained. Antibodies were purified from the culture supernatant in the same manner as in Example 4, thereby obtaining approximately 12 mg of chimeric antibodies for each transformant.

[0092] [Example 11] (Properties of chimeric antibody in hypercalcemia model animal) Therapeutic and preventive effect in hypercalcemia model animal was measured in the same manner as in Example 5 using the chimeric antibodies purified in Example 10-4. Therefore, the chimeric antibodies were shown to have an effect equivalent to that of a mouse monoclonal antibody, and to be very effective as a therapeutic and preventive agent for hypercalcemia.

[0093] Further, prostate carcinoma cells PC-3 (purchased from Dainippon Pharmaceutical) producing PTHrP were implanted to a nude mouse. When the blood calcium level reached 18 to 20 mg/dl, 300 µg of antibodies prepared in Example 4 or 10-4 were administered respectively via the caudal vein (n=5 each), so that the therapeutic and preventive effect on hypercalcemia were examined. As a result, all the mice in the groups administered with each of the antibodies survived, and the normal calcium level was maintained for 1 week or more. In contrast to this result, the calcium level of the mice in a control group remained unchanged (18 to 20 mg/dl) and most of the mice died after 3 to 4 days in average.

[0094]

[Effect of the invention] The present invention can provide a therapeutic and preventive agent for hypercalcemia which comprises an anti-human parathyroid hormone related protein monoclonal antibody or the fragment thereof, as described above. The use of the monoclonal antibody enables treatment of hypercalcemia with better results and for over a relatively longer period of time than methods using standard anti-sera or polyclonal antibodies.

[0095] Moreover, we have elucidated the sequence of the variable region of the above antibody in the present invention. By gene manipulation techniques using the sequence, a rodent/human chimeric monoclonal antibody which recognizes a human parathyroid hormone related protein is prepared. Administration of a preventive and

therapeutic agent for hypercalcemia comprising the chimeric monoclonal antibody as an active ingredient can keep allergy reaction lower, so that sufficient therapeutic effect can be obtained.

[0096]

[Sequence listing]

[0097]

[SEQ ID NO: 1]

SEQUENCE LENGTH: 98

SEQUENCE TYPE: amino acid

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: protein

FRAGMENT TYPE: internal fragment

FEATURE

Identification Method: E

Sequence

```

Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala
 1           5           10           15
Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Phe Met Asn Trp Val Met Gln Ser
 20           25           30
His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asn Pro Tyr Asn Gly
 35           40           45
Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val
 50           55           60
Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala His Met Glu Leu Arg Ser Leu Ala Ser
 65           70           75           80
Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Val Thr Thr Glu
 85           90           95
Phe Gly
 98

```

[0098]

[SEQ ID NO: 2]

SEQUENCE LENGTH: 92

SEQUENCE TYPE: amino acid

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: protein

FRAGMENT TYPE: internal fragment

FEATURE

Identification Method: E

Sequence

Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Leu	Gly	Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg
1				5					10					15	
Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Glu	Trp
		20						25					30		
Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val
		35					40					45			
Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser
	50					55					60				
Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu
65					70					75				80	
Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser	His	Val	Pro				
				85					90		92				

[0099]

[SEQ ID NO: 3]

SEQUENCE LENGTH: 116

SEQUENCE TYPE: amino acid

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: protein

FRAGMENT TYPE: internal fragment

FEATURE

Identification Method: E

Sequence

```

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
 1             5             10             15
Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly
      20             25             30
Tyr Phe Met Asn Trp Val Met Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp
      35             40             45
Ile Gly Arg Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys
      50             55             60
Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
      65             70             75             80
His Met Glu Leu Arg Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
      85             90             95
Cys Ala Arg Gly Gly Val Thr Thr Glu Phe Gly Tyr Trp Gly Pro Gly
      100             105             110
Thr Thr Val Thr
      115

```

[0100]

[SEQ ID NO: 4]

SEQUENCE LENGTH: 113

SEQUENCE TYPE: amino acid

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: protein

FRAGMENT TYPE: internal fragment

FEATURE

Identification Method: E

Sequence

```

Leu Glu Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser
 1             5             10             15
Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val
      20             25             30
His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly
      35             40             45
Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly
      50             55             60
Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
      65             70             75             80
Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe
      85             90             95
Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Ala
      100             105             110
Arg
113

```

[0101]

[SEQ ID NO: 5]

SEQUENCE LENGTH: 356

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

STRANDEDNESS: double

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: cDNA to mRNA

FRAGMENT TYPE: internal fragment

Sequence

TCTAGA ATG CAG GTT CAG CTG CAG CAG TCT GGA CCT GAG CTG GTG AAG CCT	51
GGG GCT TCA GTG AAG ATA TCC TGC AAG GCT TCT GGT TAC TCA TTT ACT	99
GGC TAC TTT ATG AAC TGG GTG ATG CAG AGC CAT GGA AAG AGC CTT GAG	147
TGG ATT GGA CGT ATT AAT CCT TAC AAT GGT GAT ACT TTC TAC AAC CAG	195
AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GTA GAC AAA TCC TCT AGC ACA	243
GCC CAC ATG GAG CTC CGG AGC CTG GCA TCT GAG GAC TCT GCA GTC TAT	291
TAT TGT GCA AGA GGG GGG GTT ACG ACG GAG TTT GGT TAC TGG GGT CCA	339
GGG ACC ACG GTC ACT AG	356

[0102]

[SEQ ID NO: 6]

SEQUENCE LENGTH: 341

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

STRANDEDNESS: double

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: cDNA to mRNA

FRAGMENT TYPE: internal fragment

Sequence

T CTA GAA GAA ATT GTG ATG ACC CAG TCT CCA CTC TCC CTG CCT GTC AGT	49
CTT GGA GAT CAA GCC TCC ATC TCT TGC AGA TCT AGT CAG AGC ATT GTA	97
CAT AGT AAT GGA AAC ACC TAT TTA GAA TGG TAC CTG CAG AAA CCA GGC	145
CAG TCT CCA AAG CTC CTG ATC TAC AAA GTT TCC AAC CGA TTT TCT GGG	199
GTC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA GAT TTC ACA CTC	241
AAG ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT CTG GGA GTT TAT TAC TGC TTT	289
CAA GGT TCA CAT GTT CCG TAC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GCT	337
CGA G	341

[0103]

[SEQ ID NO: 7]

SEQUENCE LENGTH: 34

SEQUENCE TYPE: amino acid

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: peptide

FRAGMENT TYPE: internal fragment

FEATURE

Identification Method: S

Sequence

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln

1

5

10

15

Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile Ala Glu Ile His

20

25

30

Thr Ala

[0104]

[SEQ ID NO: 8]

SEQUENCE LENGTH: 32

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

STRANDEDNESS: single

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: other nucleic acid, synthetic DNA

Sequence

TCTAGAATGC AGGTYCAGCT GMAGCAGTCW GG

32

[0105]

[SEQ ID NO: 9]

SEQUENCE LENGTH: 42

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

STRANDEDNESS: single

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: other nucleic acid synthetic DNA

Sequence

GGTGTTCCCTC GAGGTCTAGT GACCGTGGTC CCTKSRRCCC AG

42

[0106]

[SEQ ID NO: 10]

SEQUENCE LENGTH: 37

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

STRANDEDNESS: single

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: other nucleic acid, synthetic DNA

Sequence

CGTGGCTCTA GAAGAAATTG TGMTGACCCA GTCTCCA

37

[0107]

[SEQ ID NO: 11]

SEQUENCE LENGTH: 34

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

STRANDEDNESS: single

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: synthetic DNA

Sequence

AACTCGAGCC AGCTTGGTCC CMSCWCCGAA CGTG 34

[0108]

[SEQ ID NO: 12]

SEQUENCE LENGTH: 48

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

STRANDEDNESS: single

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: other nucleic acid, synthetic DNA

Sequence

AGGTGCAGCT ACAGCAGTGG GGCGCAGGAC TGGTGAAGCC TTCGGAGA 48

[0109]

[SEQ ID NO: 13]

SEQUENCE LENGTH: 66

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

STRANDEDNESS: single

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: other nucleic acid, synthetic DNA

Sequence

ACTACTACTA TGGTATGGAC GTCTGGGGCC AAGGGACCAC GGTCACCGTC TCCTCA 66

[0110]

[SEQ ID NO: 14]

SEQUENCE LENGTH: 50

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

STRANDEDNESS: single

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: other nucleic acid, synthetic DNA

Sequence

ACTGTGGCTG CACCATCTGT CTTTCATCTTC CCGCCATCTG ATGAGCAGTT 50

[0111]

[SEQ ID NO: 15]

SEQUENCE LENGTH: 89

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

STRANDEDNESS: single

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: other nucleic acid, synthetic DNA

Sequence

CCTCTAGATG AACTTCGGGC TCAGCTTGAT TTACCTTGTC CTGGTTTAA AAGTTGTCCA 60
GTGTCAGGTT CAGCTGCAGC AGTCTGGAC 89

[0112]

[SEQ ID NO: 16]

SEQUENCE LENGTH: 109

SEQUENCE TYPE: nucleic acid

STRANDEDNESS: single

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: other nucleic acid, synthetic DNA

Sequence

CCTCTAGATG GGCATCAAGA TGGAGACACA TTCTCAGGTC TTTGTATACA TGTTGCTGTG 60

GTTGTCTGGT GTTGAAGGAG AAATTGTGAT GACCCAGTCT CCACTCTCC

109

[Brief description of drawings]

[Fig. 1] A graph shows therapeutic and preventive effect of anti-PTHrP monoclonal antibody against hypercalcemia when a hypercalcemia model animal was used.

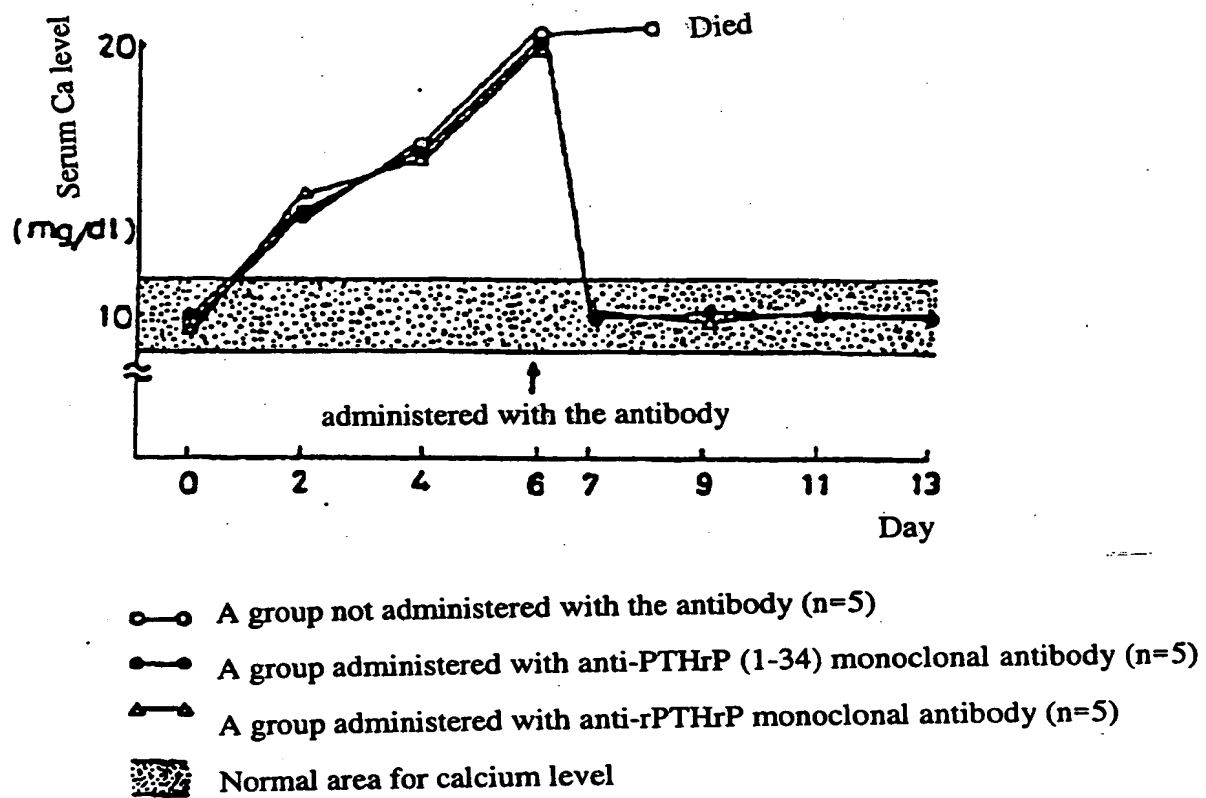
[Fig. 2] An explanatory drawing shows construction of pSVeH26 to be used for preparing an expression vector having a gene encoding the chimeric monoclonal antibody of the present invention.

[Fig. 3] An explanatory drawing shows construction of pSVeL26 to be used for preparing an expression vector having a gene encoding the chimeric monoclonal antibody of the present invention.

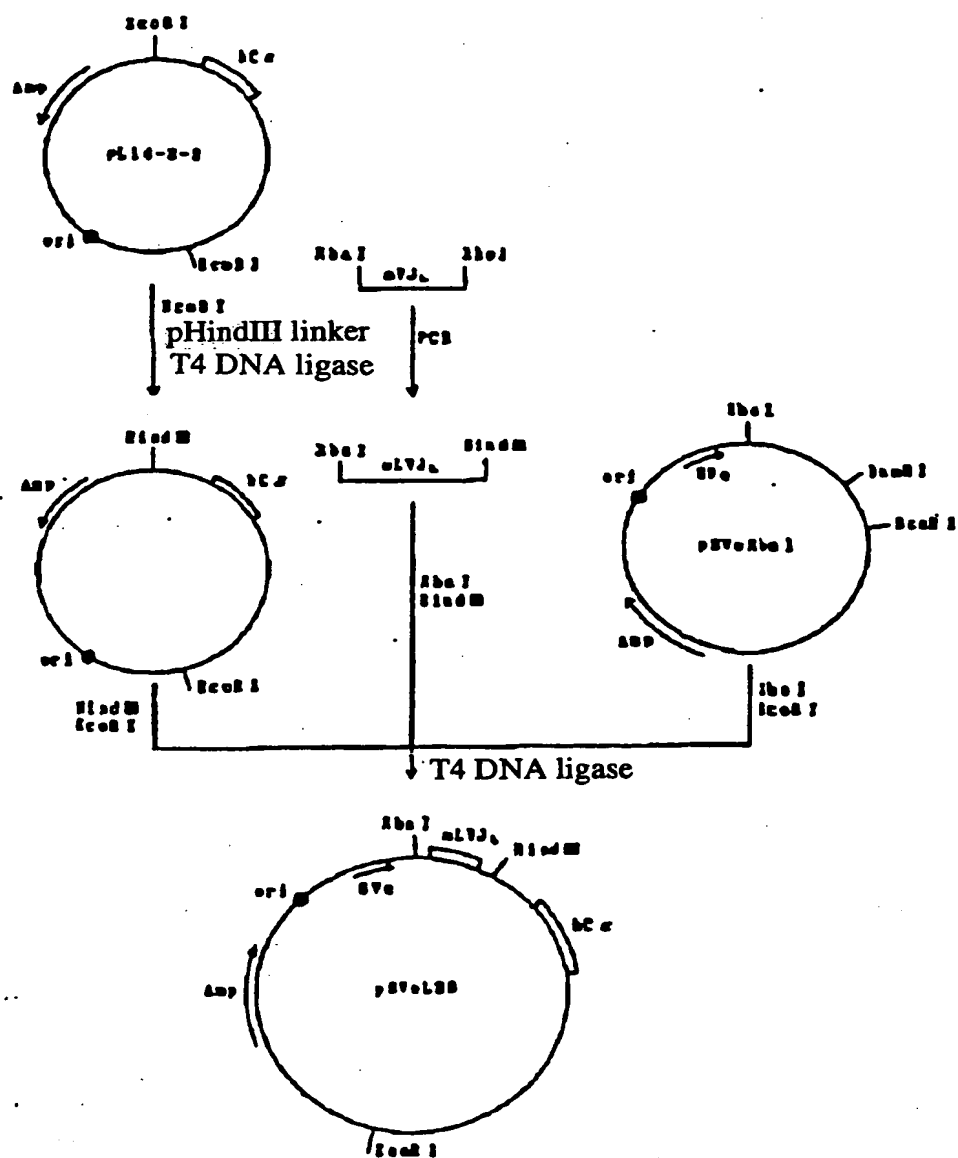
[Fig. 4] An explanatory drawing shows construction of pSVeHL26 which is an expression vector having a gene encoding the chimeric monoclonal antibody of the present invention.

[Fig. 5] An explanatory drawing shows construction of pSVeHL26-DM which is an expression vector having a gene encoding the chimeric monoclonal antibody of the present invention.

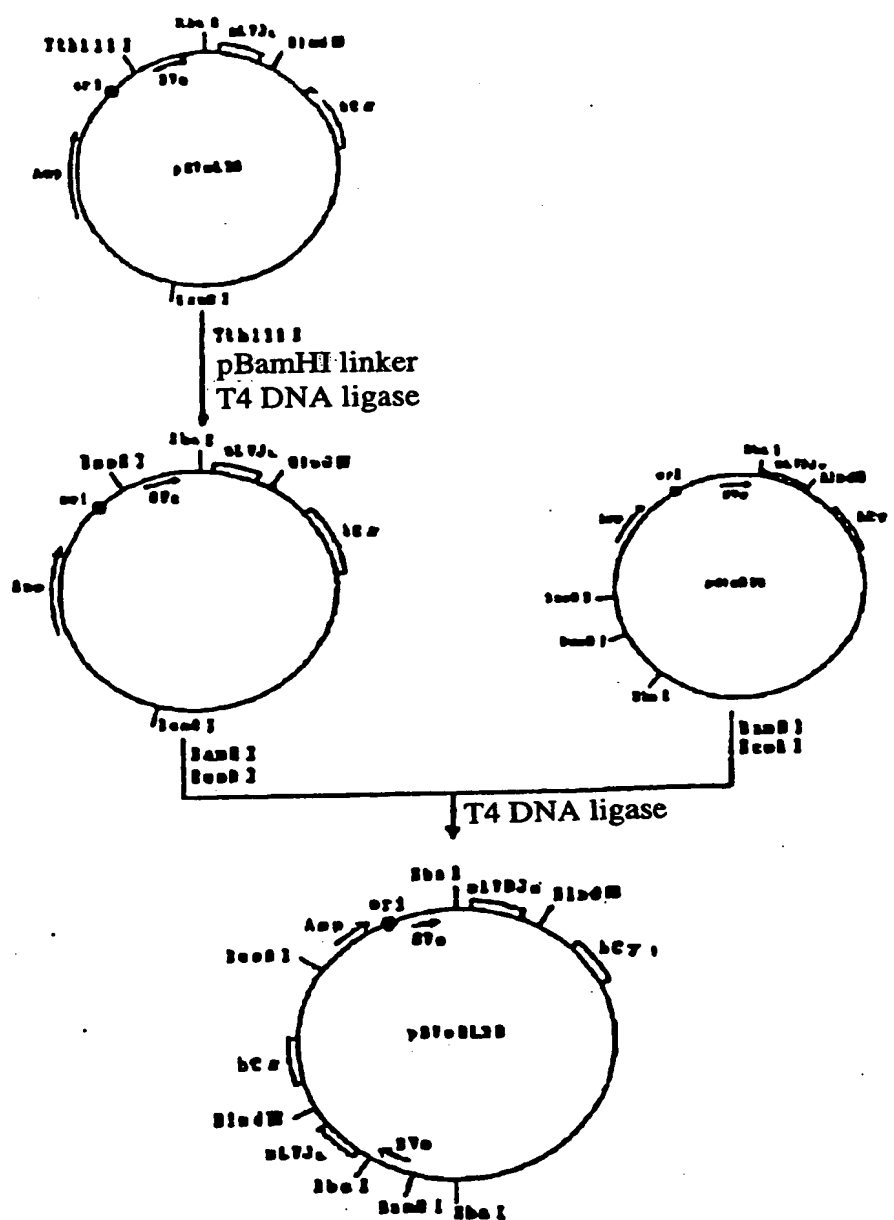
[Fig. 1]



[Fig. 3]



[Fig. 4]



[Fig. 5]

